

tivación y localización nuclear de β -catenina. Los Wnt que más frecuentemente activan esta vía en melanoma son Wnt1 y Wnt3a. Originalmente se considero que la vía canónica tenía un rol prooncogénico pero en la actualidad su rol se encuentra sujeto a debate (10).

La activación constitutiva de la vía no-canónica, fundamentalmente a través de Wnt5a, también es una característica distintiva de melanoma aunque se desconocen en profundidad los mecanismos moleculares involucrados. La expresión de otros Wnt "no canónicos" asociados a otros tipos de tumores como Wnt2, Wnt4, Wnt7b y Wnt11 no ha sido estudiada en melanoma. Wnt5a se encuentra sobreexpresada en melanoma (presumiblemente por la acción de STAT3) e induce aumentos en la adhesión, motilidad e invasión, la activación de EMT (Transición Epitelial-Mesenquimal), la inhibición de la expresión de supresores de metástasis como Kiss-1 y el aumento de expresión de activadores de metástasis como CD44 (11). Muchos de estos efectos son mediados por la activación de PKC, aunque persisten dudas sobre que isoforma es la involucrada. Sin embargo, debe hacerse notar que algunos de los experimentos en estos trabajos fueron realizados induciendo la sobreexpresión de Wnt5a en células que naturalmente expresaban altos niveles de este ligando, lo cual relativiza el significado de estas conclusiones. Interesantemente, la detección de Wnt5a en biopsias se correlacionó directamente con estadios más avanzados e inversamente con la sobrevida del paciente. La sobreexpresión de Wnt5a en los tumores es localizada y ocurre en sitios de invasión activa y las células muestran características morfológicas asociadas a un comportamiento agresivo. Los receptores de Wnt5a caracterizados hasta el presente en melanoma son Fzd5 y Ror2. La expresión de este ultimo no solo correlaciona con la de Wnt5a sino que es necesaria para la inducción de metástasis de células B16 dependiente de Wnt5a.

Referencias bibliográficas

1. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010; 106: 1798-806.
2. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 2008; 1: re9.
3. Masiakowski P, Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 26181-90.
4. Green JL, Kuntz S, Sternberg PW. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* 2008; 18: 536-44.
5. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, Levy JM, *et al.* Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase Ror1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 396-404.
6. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara

B, *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 2003; 8: 645-54.

7. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 2010; 24: 2517-30.
8. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 591-600.
9. O'Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 724-39.
10. McDonald SL, Silver A.. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 209-14.
11. O'Connell MP, Fiori JL, Xu M, Carter AD, Frank BP, Camilli TC, French AD, *et al.* The orphan tyrosine kinase receptor, Ror2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. *Oncogene* 2010; 29: 34-44.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA MOLECULAR

siARN y shARN: Aspectos básicos y aplicados. Su uso como agentes terapéuticos

siRNA and shRNA: basic and applied aspects. Their use as therapeutic agents

siARN e shARN: aspectos básicos e aplicados. Seu uso como agentes terapêuticos

Carolina Flumian, Gabriela Levy, Gabriela Bravo, Carla Gatto Cáceres, Martín Gómez, Adrián Góngora, Alberto Baldi

Resumen

La interferencia del ARN es un fenómeno por el cual pequeñas moléculas de ARN doble cadena inhiben la expresión génica de manera secuencia específica. Esta vía se encuentra altamente conservada en los organismos eucariotas. Existen varios tipos de ARN interferentes, entre ellos se encuentran los shARN (del inglés *short hairpin RNA*) que a su vez, dan lugar a los siARN (del inglés *small interfering RNA*). La activación de esta vía de manera exógena constituye una estrategia prometedoras para el tratamiento de múltiples enfermedades humanas tales como el cáncer, las infecciones virales, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. En el presente artículo se realiza la

descripción de estas pequeñas moléculas, así como también de la vía involucrada y cuáles son los efectos de su activación. También se explican los problemas que presenta su aplicación y las perspectivas de su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: iARN * siARN * shARN * silenciamiento génico * vectores virales * cáncer

Summary

RNA interference is a phenomenon in which small double stranded RNAs mediate sequence-specific regulation of gene expression. This pathway is highly preserved in eukaryotic organisms. There are many types of interfering RNAs, among them, shRNAs (short hairpin RNA) which give rise to siRNA (small interfering RNA). The exogenous activation of this pathway is a promising strategy as a treatment for various human diseases such as cancer, viral infections, autoimmune, and neurodegenerative diseases. In this article these small molecules, the pathway involved and the effects of their activation are described. In addition, the problems and perspectives of their application as therapeutic agents are presented.

Key words: iRNA * siRNA * shRNA * gene silencing * viral vectors * cancer

Resumo

A interferência do ARN é um fenômeno pelo qual pequenas moléculas de ARN cadeia dupla inibem a expressão gênica de maneira sequencial específica. Esta via se encontra altamente conservada nos organismos eucariotas. Existem vários tipos de ARN interferentes, entre eles se encontram os shARN (do inglês short hairpin RNA) que por sua vez, dão lugar aos siARN (do inglês small interfering RNA). A ativação desta via de maneira exógena constitui uma estratégia promissora para o tratamento de múltiplas doenças humanas tais como o câncer, as infecções virais, as doenças autoimunes e neurodegenerativas. No presente artigo é realizada a descrição destas pequenas moléculas, bem como da via envolvida e quais são os efeitos de sua ativação. Também se explicam os problemas que apresenta sua aplicação e as perspectivas de seu uso como agentes terapêuticos.

Palavras chave: iARN * siARN * shARN * silenciamiento génico * vetores virais * câncer

Interferencia del ARN

La interferencia del ARN (iARN) es un mecanismo muy conservado en el cual moléculas pequeñas de ARN silencian la expresión génica de manera post-transcripcional (1). Esta vía ha sido reconocida como una de las principales formas de regulación de la expresión génica en células eucariotas (2). Existen varios tipos de ARN pequeños regulatorios. Entre ellos, se encuentran los ARNs pequeños interferentes (siARN, del inglés *small interfering*

RNAs) que consisten en moléculas de ARN doble cadena de 21-23 nucleótidos con 2 ó 3 nucleótidos libres en el extremo 3' de manera simétrica (3). También existen los shARN (del inglés *short hairpin RNA*) que son ARNs doble cadena que poseen una zona perfectamente complementaria y un rulo que no presenta complementariedad. Los shARNs son tomados en el citoplasma por una enzima llamada Dicer, que es una ribonucleasa tipo III, que corta el shARN dando lugar al siARN (4). Entonces, los siARNs son incorporados a un complejo llamado RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) cuyo núcleo catalítico está constituido por la proteína Argonauta 2 (Ago2) que degrada una de las dos hebras. Cuál de las dos hebras es degradada se determina por las propiedades termodinámicas de las terminales del siARN que, a su vez, determinan su orientación dentro del Ago2 y cuál de las dos hebras va a servir como hebra guía (5). Esto da lugar a un complejo RISC activado que contiene un fragmento de ARN simple cadena que es antisentido con respecto al ARN mensajero (ARNm) blanco (6). Este complejo permite la unión con el ARNm y Ago2 rompe la unión fosfodiéster del ARNm que se ubica en el medio del sitio de reconocimiento siARN:ARNm. Los fragmentos del ARNm resultantes son liberados, y, por ende, son degradados al ser reconocidos como transcritos aberrantes. El complejo activado puede actuar sobre varias moléculas de ARNm de manera sucesiva, ampliando el efecto de silenciamiento (7).

Por otro lado, además del efecto post-transcripcional, los siARNs promueven la modificación del ADN, facilitando el silenciamiento de la cromatina, mediante la expansión de segmentos de heterocromatina, a través del complejo RITS (del inglés *RNA-induced transcriptional silencing*) (8).

Silenciamiento génico selectivo

Conociendo la existencia de este tipo de mecanismo en los organismos, se pensó en la posibilidad de regular la expresión de ciertos genes induciendo esta vía por medio de la introducción de siARNs de manera exógena. Esto podría permitir contrarrestar la sobreexpresión de genes que se observa en distintas patologías, entre ellas, el cáncer. La interferencia de la expresión del ARN puede ser lograda de dos formas: 1) mediante la introducción al citoplasma de siARNs, o 2) mediante la incorporación al núcleo de casetes que codifiquen shARNs. En ambos casos, el mecanismo de ARNi sólo permite una inhibición parcial o *knock down* de la expresión del gen de interés, a diferencia de las técnicas existentes de *knock out* (9).

Se debe tener en cuenta que la eficacia del siARN diseñado depende de la accesibilidad de la zona de apareamiento en el ARNm, de la presencia de estructuras secundarias o de su asociación con proteínas.

Efectos inespecíficos (*off-target*)

Los siARNs y los shARNs, pueden producir una reducción no deseada de la expresión de algunos genes cuya secuencia es similar a la reconocida por siARN, debido al corte del ARNm correspondiente o por la inhibición de su traducción (10)(11). Estos efectos pueden reducirse mediante la modificación química del segundo residuo de la hebra activa del siARN, sin afectar al silenciamiento del ARNm específico (12). Además, es necesario eliminar en el diseño todos los siARNs que presenten una cierta similitud con las moléculas de ARNm no buscadas, mediante la utilización de BLAST.

El problema de la llegada a destino

Los siARNs son moléculas cargadas negativamente que no pueden penetrar fácilmente las membranas lipídicas celulares sin algún compuesto carrier que las asista. Además, los siARNs que no se modifican químicamente generalmente son degradados por las ARNasas presentes en el suero. A su vez, se debe tener en cuenta la dificultad adicional que representa la administración *in vivo* de siARNs, ya sea que se realice de manera sistémica o localizada.

In vitro, estas dificultades pueden ser superadas para la mayoría de los tipos celulares si los siARNs se unen a reactivos lipídicos catiónicos. Sin embargo, existen muchas limitaciones en el uso de esta estrategia debido a la falta de especificidad con respecto al tipo celular que se pretenda como blanco del tratamiento, como así también, debido a la toxicidad de muchos de estos reactivos.

Con el fin de lograr una mayor especificidad de los siARNs por la población celular blanco *in vivo*, se ha desarrollado una serie de estrategias que incluyen la conjugación de los siARNs a agentes que reconocen de manera específica moléculas presentes en la superficie celular de la población blanco, como por ejemplo anticuerpos, ligandos y aptámeros.

La duración del efecto de silenciamiento

Las formas antes mencionadas de administración de los siARNs llevan a un silenciamiento transitorio, ya que la concentración intracelular de los siARNs va a ir disminuyendo debido a las divisiones celulares y a su degradación. Por el contrario, si se logra que la población blanco exprese los shARNs de interés, esto va a permitir que el efecto de silenciamiento dure hasta tanto la célula los transcriba. Esto es una cualidad ideal para el tratamiento de enfermedades crónicas. En este contexto, los virus y vectores derivados de los mismos constituyen un sistema que permite no sólo superar el problema de atravesar la membrana plasmática, sino también de penetrar la envoltura nuclear resultando en la incorpora-

ción de la secuencia que codifica para el shARN al genoma, posibilitando la expresión de los shARNs de manera estable.

El diseño de vectores virales fue posible gracias al descubrimiento de que la expresión de shRNAs induce la maquinaria de ARNi (13). Esta estrategia involucra el clonado de un oligonucleótido que codifica para el shARN en un plásmido o vector viral que permite la expresión endógena del shARN, que luego es procesado en el citoplasma de la célula hospedadora, dando lugar a los siARNs.

Perspectivas terapéuticas

Un gran número de trabajos constituyen la prueba de que el mecanismo de ARNi puede ser potencialmente utilizado para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (14)(15). Más aún, algunos siARNs ya están siendo utilizados en pruebas clínicas (16). Particularmente, en nuestro laboratorio, teniendo como modelo de trabajo al melanoma humano, nos propusimos estudiar los beneficios del silenciamiento de factores proangiogénicos que se encuentran sobreexpresados en este tipo de cáncer como posible terapia, ya que estos genes contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad. Con este fin, hemos desarrollado algunos shARNs que tienen como blanco a uno de estos factores y, utilizando vectores virales derivados de retrovirus, se lograron establecer líneas celulares que expresan de manera estable el shARN y que muestran un silenciamiento de entre el 75 y el 95% que, a su vez, correlaciona con un aumento en la apoptosis.

Sin embargo, y a pesar del gran potencial de estas técnicas, existen grandes limitaciones en el uso de siARNs debido a las fallas con respecto a la seguridad y efectividad de los métodos para su administración específica en los tejidos o tipos celulares deseados. A pesar de estas dificultades consideramos que, con el continuo avance en las investigaciones, estas dificultades podrán ser superadas y que el uso de siARNs y shARN dará lugar a tratamientos efectivos contra enfermedades humanas.

Referencias bibliográficas

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
2. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development. *Cell* 2006; 124: 877-81.
3. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-85.
4. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.
5. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115(2): 199-208.

6. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 23-36.
7. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
8. Matzke MA, Matzke AJM. Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol* 2004; 2(5): E133.
9. Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 322-33.
10. Li C, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf J. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 2006; 5(18): 2103-9.
11. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci* 2006; 97(8): 689-96.
12. Tong A, Zhang Y, Nemunaitis J. Small interfering RNA for experimental cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7(2): 114-24.
13. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 2002; 296:550-3.
14. Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; 126(2): 231-5.
15. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009; 457(7228): 426-33.
16. Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med* 2009; 1(3): 142-51.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA MOLECULAR

Potencial proangiogénico de los productos de disolución de materiales vítreos bioactivos

Angiogenic potential of bioactive glasses ionic dissolution products

Potencial proangiogênico dos produtos de dissolução de materiais vítreos bioativos

Luis A. Haro Durand^{1,2}, Adrián Góngora¹, Martín Gomez¹, Alberto Baldi¹, Alejandro Gorustovich²

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental IByME- CONICET, Buenos Aires, Argentina; ²Grupo Interdisciplinario en Materiales, IESIING-UCASAL, INTECIN, UBA-CONICET, Salta, Argentina

Resumen

La angiogénesis es un proceso complejo caracterizado por una cascada de eventos que llevan a la activación, proliferación y migración de células endoteliales y al remodelado y estabilización del tejido vascular. Recientes intentos por estimular angiogénesis se han enfocado en la entrega de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), terapia génica y terapia basada en células, pero estos procedimientos son caros y los mecanismos de entrega óptimos son aún poco comprendidos, por lo tanto, contar con estrategias más sencillas y menos costosas para inducir angiogénesis, representarían una muy buena alternativa al uso de factores de crecimiento costosos para estimular la neovascularización en un tejido en reparación. Los vidrios bioactivos han sido ampliamente investigados para la regeneración de tejido óseo, sin embargo ha habido poca investigación en la aplicación de los vidrios bioactivos para reparar tejidos blandos altamente vascularizados y particularmente, la influencia que tienen sobre la neovascularización. Sin embargo recientes trabajos han mostrado la habilidad de los vidrios bioactivos para promover angiogénesis lo cual es crítico para numerosas aplicaciones en la reparación de herida y en estrategias para la ingeniería de tejidos. Este artículo, en la primera parte; presenta una visión general de los vidrios bioactivos haciendo énfasis en las características que determinan la bioactividad de los vidrios de silicato bioactivos y en la segunda parte, revisa la evidencia existente en la bibliografía sobre estudios que han demostrado el potencial de los vidrios bioactivos, particularmente el 45S5 Bioglass® de estimular la angiogénesis, a través de sus productos de disolución iónica.

Palabras clave: angiogénesis * vidrios bioactivos * bioglass * reparación y regeneración de tejidos * ingeniería de tejidos

Summary

Angiogenesis is complex multi-step process that involves endothelial cell activation, dissolution of surrounding basement membrane, increased endothelial cell proliferation and migration, tube formation to form a vascular network. Recent attempts to stimulate angiogenesis have focused on the delivery of growth factors and cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), gene therapy and cells-based therapy. However the growth factors are expensive and the optimal delivery strategies are unclear. Therefore use others easier and cheaper strategies to induce angiogenesis could provide and alternative approach to the use of expensive growth factor for stimulating neovascularization of wound repair. While the bioactive glasses have been extensively investigated for bone repair and regeneration, there has been relatively little research on the application of bioactive glass to highly vascularized soft tissues repair and particularly, the effect on the neovascularization. However, there is emerging evidence in the literature that the use of bioactive glasses in biomaterial-based tissue engineering strategies may improve the vascularization, it is the major limitation of tissue engineer-