

REVISIÓN

El silenciamiento génico

Sánchez, Mercedes Leonor¹

Laboratorio Inmunomoduladores en Transplantes e Infecciones, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CEFYBO, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Sánchez, Mercedes Leonor;
mercedessanchez57@yahoo.com.ar; mercedes.sanchez@conicet.gov.ar

Resumen

En la célula existen muchas formas de regular la expresión génica. Una de ellas es por medio del silenciamiento génico, que constituye un mecanismo celular mediante el cual se inhibe la expresión de genes, controlando la expresión de genes endógenos y exógenos. Este representa un papel importante en la regulación del desarrollo, en la diferenciación celular y en la defensa contra secuencias de organismos invasores y transposones. Tiene lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula y puede participar en la regulación de la etapa de transcripción y de traducción. El ARN doble hebra suele ser la señal de activación del mecanismo de silenciamiento génico. Hasta el momento se ha demostrado que el silenciamiento génico ocurre en plantas, algas unicelulares, hongos, nematodos [*Caenorhabditis elegans*], la mosca de la fruta [*Drosophila melanogaster*] y en células de mamíferos. Su utilidad en biotecnología y medicina ha sido ampliamente desarrollada. El ARN de interferencia se ha convertido en una herramienta de experimentación para la caracterización funcional de genes en el laboratorio y en muchas áreas de investigación científica. La siguiente revisión incluye información acerca del desarrollo de estrategias para la aplicación del ARN de interferencia en organismos vivos y su aplicación en la terapéutica.

Palabras clave. Silenciamiento de genes, ARN de interferencia, ARNi, ARNsi, ARN pequeño de horquilla, ARNsh.

Abstract

Gene expression in the cell is regulated by many different ways. One is through gene silencing, which constitutes a cellular mechanism by which the expression of genes is inhibited, controlling the expression of endogenous and exogenous genes. This mechanism plays an important role in the regulation of development, cell differentiation and defense against sequences from invading organisms and transposons. It takes place both in the nucleus and in the cytoplasm and participates in the regulation of transcription and translation. The signal of activation of gene silencing is often double-stranded RNA. So far, gene silencing has been shown to occur in plants, single-cell algae, fungi, nematodes [*Caenorhabditis elegans*], fruit fly [*Drosophila melanogaster*] and mammalian cells. Its usefulness in biotechnology and medicine has been widely studied. Interference RNA has become an experimentation tool for the functional characterization of genes in the laboratory and in many areas of scientific research. The following review includes information on the development of strategies for the application of interfering RNA in living organisms and their application in therapeutics.

Key words. Gene silencing, interference RNA, small interference RNA, siRNA, small hairpin RNA, shRNA.

Introducción

El silenciamiento por ARN es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza, en el que moléculas de ARN de doble hebra [del inglés "*double strand RNA* o *dsRNA*"] regulan la expresión de genes.

El fenómeno fue inicialmente descubierto en 1990, cuando los botánicos Napoli, Lemieux y Jorgensen, trabajando en Oakland, California, introdujeron varias copias del gen que codifica para una enzima, que produce el color púrpura en las petunias, describiendo que se generaban flores sin color o con parches blancos [1]. Los niveles de la enzima eran 50 veces menores que los de las plantas originales. Los genes que introdujeron no se estaban expresando y el gen natural de la planta dejaba de expresarse, razón por la cual al fenómeno se lo llamó co-supresión.

En 1992 Romano, Macino y Quelling, trabajando en Roma, Italia, describieron un fenómeno equivalente en un hongo conocido como *Neurospora crassa* [2]. Y en 1998, en Baltimore, Maryland, Fire, Xu, Montgomery, Kostas, Driver y Mello descubrieron que tras la inyección de ARN de doble hebra dentro del nematodo *Caenorhabditis elegans* se producía un silenciamiento de la expresión de genes que era específico de secuencia, y fue denominado interferencia de ARN o ARNi [RNA Interference RNAi] [3]. Andrew Fire y Craig Mello recibieron el premio Nobel de Medicina en el 2006.

Un transposón o elemento genético transponible es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición. En este proceso, se pueden ocasionar mutaciones y cambios en la cantidad de ADN del genoma. La trasposición implica que un segmento de ADN se mueve directamente de una posición a otra en el genoma, usando una enzima transposasa para cortar y pegarse. A diferencia de los provirus, los transposones se integran en el ADN celular en lugares bien determinados. Barbara McClintock recibió el Premio Nobel de Medicina en 1983 por haber propuesto su existencia en el maíz. Su presencia en bacterias no se demostró hasta mucho más tarde.

Hasta el año 2000, el ARNi se utilizó como herramienta para apagar la expresión de genes en varios organismos. En mamíferos, se observó que las moléculas grandes de ARN de doble hebra [de más de 30 pares de bases] inducen una respuesta que generalmente desencadena la muerte de la célula. Sin embargo, posteriormente, Elbashir, Harborth, Lendeckel, Yalcin, Weber y Tuschl describieron que cuando se utilizan directamente los ARN pequeños de interferencia [ARNsi, del inglés "*small interference RNA* o *siRNA*"], es posible inducir el proceso de interferencia en células de mamífero, sin que se despierte la respuesta que conduce a la muerte celular [4-7]. Este descubrimiento abrió la posibilidad de utilizar la interferencia de ARN como una herramienta en la investigación enfocada a células de mamíferos.

El Dr. Tuschl caracterizó molecularmente los pequeños ARNsi, una clase de moléculas bicatenarias de 21 nucleótidos de longitud que guían el silenciamiento de genes

específicos de la secuencia y fue el primero en demostrar su utilidad para inhibir la expresión génica humana. Estos ARNsi se procesan a partir de precursores de ARN de doble cadena más largos y se ensamblan en complejos efectores que desestabilizan ARN mensajeros, parcial o totalmente complementarios a una de las cadenas de ARNsi.

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia. Existen tres tipos de ARN pequeños que pueden silenciar el ARNm en el citoplasma [8,9]: los piwi-ARNs [*piRNAs*], los microARN [*miRNAs*], y los ARNsi [*siRNAs*].

Los microARN [en inglés, *micro-RNA* o *miRNA*] son pequeños ARN interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas [*hairpins*] intramoleculares, las que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Como ocurre con los *siRNA*, una de las hebras del *miRNA* [la hebra antisentido], se incorpora a un complejo similar al RISC. Dependiendo del grado de complementariedad del miARN con el ARNm, los miARN pueden bien, inhibir la traducción del ARNm o bien inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia de la vía de los ARNsi, la degradación de ARNm mediada por miARN se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poli(A) del ARNm [10]. Estos microARNs están involucrados en muchos procesos biológicos e incluso se expresan en virus [en particular, miembros de la familia herpesvirus] controlando la estabilidad del ARN mensajero y la traducción de cientos de dianas del ARN mensajero.

Los ARNsi tienen origen exógeno mientras que los *mi-croRNA* están codificados en el genoma de la célula.

Los *piRNAs* [11,13] son pequeños ARN no codificantes de 21-24 nucleótidos de longitud, que regulan principalmente la actividad del transposón en el desarrollo de la línea germinal al unirse a proteínas Piwi, un subconjunto de la clase Argonauta de proteínas. Los *piRNAs* se expresan específicamente en células de línea germinal de hembras y machos y son necesarios para el desarrollo normal de células germinales. La eliminación de los genes piwi en ratones causa infertilidad masculina. Los esfuerzos para caracterizar su biogénesis están en curso, pero se ven obstaculizados por la falta de líneas celulares que expresan *piRNAs*.

Posteriormente se descubrió que el complejo RISC unido a la hebra molde del ARNsi puede llevar a cabo silenciamiento génico a nivel del núcleo, puesto que logra entrar en el mismo, reconocer secuencias específicas del genoma y alterar el patrón de metilación del ADN y de las histonas provocando el silenciamiento del gen antes de que llegue, incluso, a transcribirse.

Al tratarse de un mecanismo de regulación génica, el ARNi tiene un papel clave en los procesos de desarrollo y diferenciación celular, en situaciones patológicas como el cáncer y en defensa frente a virus.

Mecanismos de silenciamiento génico

El mecanismo de la ARNi fue explicado *in vitro* utilizando como modelo la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* [11]. Estos estudios revelaron que moléculas largas de ARN de doble hebra eran cortadas en fragmentos pequeños con una estructura específica: dos hebras de 21 a 25 nucleótidos interaccionando en forma de dúplex, donde 19 nucleótidos se encuentran formando ARN de doble hebra con dos nucleótidos sin aparearse en los extremos.

Los ARNsi son producidos a partir de precursores de ARN de doble hebra, que varían de tamaño y origen. Estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan al ARN, conocidas como la familia de la ARNasa tipo III. En particular, la enzima que genera los ARNsi se conoce como Dicer. Estos ARNs resultantes son incorporados a un complejo denominado complejo de silenciamiento inducido por el ARN o RISC (*RNA-induced silencing complex*) [12]. Este complejo está compuesto por numerosas proteínas celulares. La incorporación del ARNsi al RISC está acoplada a la separación de las dos hebras en cadenas simples, una de las cuales, conocida como hebra guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar al ARN mensajero blanco con el cual se va a complementar. Cuando las moléculas de ARN complementarias hibridan, la interacción entre el ARNsi y este ARNm determina su corte y posterior degradación. La hebra guía del ARNsi y el ARNm blanco deben presentar una perfecta complementariedad cerca del sitio de rompimiento o ruptura, el cual se sitúa a 10-11 nucleótidos del extremo 5' del ARNsi [13].

Se trata de un mecanismo específico ya que el silenciamiento génico se basa en la complementariedad de bases entre la molécula de ARNsi y la molécula de ARN mensajero. Si la complementariedad de bases es perfecta se producirá la hidrólisis del mensajero mientras que, si no lo es, simplemente se inhibirá la traducción al impedir la unión del ribosoma.

La represión de la expresión de los genes mediante el silenciamiento génico puede ocurrir a dos niveles: transcripcional y post-transcripcional.

El silenciamiento génico transcripcional (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) tiene lugar en el núcleo de la célula. Mediante el TGS se inhibe la síntesis de ARNm, es decir, no ocurre la transcripción. En este caso, los genes están silenciados por modificaciones como el reordenamiento del ADN, y la modificación química de las histonas como la adición de un grupo metilo [-CH₃]. Todos estos mecanismos pueden inducir a la formación de heterocromatina, es decir, se constituyen en zonas de ADN de alta densidad que impiden el acceso de la "maquinaria transcripcional" y que, por ende, los genes que se encuentran en esa región, no se expresan. En plantas, los ARNsi pueden ser transportados al núcleo e inhibir la síntesis del ARNm del gen correspondiente.

En cambio, en el silenciamiento génico postranscripcional (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) hay transcripción del gen silenciado. Lo que ocurre es que el ARNm sintetizado es degradado de forma específica, en función de su

secuencia. En este caso tampoco habrá síntesis proteica del gen que está siendo "silenciado".

Otro fenómeno importante que ocurre en varios organismos, pero no en mamíferos, es que los mediadores de la interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otras células del organismo. De esta manera es posible lograr que se silencie la expresión de un gen en el organismo completo, aunque la inducción original haya sido solamente en una parte. En este tipo de organismos, como el gusano *C. elegans*, el silenciamiento es heredable.

El mecanismo de interferencia está presente en todos los eucariotas en los que se ha buscado; esto sugiere que es un mecanismo muy antiguo que apareció temprano en la evolución y que tiene un papel importante en el mantenimiento del funcionamiento celular.

Una de las principales estrategias utilizadas en la investigación científica para el estudio de los distintos mecanismos celulares se denomina "pérdida de función". Este concepto se refiere a la eliminación específica de la función de una proteína en la célula, para después evaluar los cambios y así definir el papel que juega dicha proteína. Por ejemplo, si se tratara de una proteína que se requiere para promover la replicación celular, al anular su función se encontraría que las células ya no se replican. Esta estrategia ha sido extensamente utilizada desde hace tiempo. La anulación de la función se puede realizar de varias maneras.

Knock down es una expresión en inglés que indica una disminución en la expresión de un gen mediante ARNi. Una segunda técnica es lo que denominamos "noquear el gen" (*knock-out*, KO), en este caso el gen se elimina del genoma y por lo tanto la proteína de interés ya no es expresada en la célula. Estas estrategias requieren modificar la información a nivel del ADN, es decir, del gen. Regularmente estos enfoques requieren de entrenamiento especializado y de mucho trabajo.

Dentro de las estrategias para el uso efectivo de la interferencia de ARN se pueden considerar dos tipos de ensayos: los transitorios, donde la expresión del gen se interfiere sólo temporalmente y los estables en los cuales las células o el organismo son permanentemente interferidos.

En el *knock down* la inhibición del gen no es total, esto se diferencia del *knock out* donde el gen es eliminado completamente del genoma.

En el primer caso suelen utilizarse los ARNsi sintetizados químicamente; para el segundo, se requiere que la célula incorpore a su genoma los elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble hebra que llegue hasta el citoplasma.

La interferencia de ARN ha demostrado su enorme potencial, lo que se refleja en el creciente número de artículos científicos que la refieren como estrategia experimental.

Síntesis de ARNsi

La síntesis de los ARNsi puede hacerse por varias vías. En el caso de plantas e invertebrados, se pueden utilizar molé-

culas grandes de ARN de doble cadena, que serán procesadas a ARNsi dentro de la célula. En este trabajo se habla de ARN pequeño de horquilla o ARNsh, por lo tanto es necesario hacer una aclaración sobre esta terminología.

Hairpin (horquilla) es una estructura que presenta el ADN o el ARN cuando una hebra con secuencias de nucleótidos repetidas e invertidas se dobla sobre sí misma y forma una estructura de doble hebra con las secuencias invertidas, ahora complementarias y un dobléz en forma de “bucle” en un extremo. Esta se conoce en inglés como *hairpin*.

En vertebrados es necesario utilizar directamente moléculas de ARNsi o bien ARN pequeños de horquilla (*short hairpin RNA* o ARNsh). La fuente más común es la síntesis química del ARN de doble hebra.

Los ARNsi son sintetizados y usados fácilmente [14]. La desventaja es el corto tiempo de duración del silenciamiento y que no resulta fácil introducirlos en células como los cultivos primarios. Pueden ser el método de elección ya que la mayoría de los experimentos son completados en tres a siete días. Este período depende del grado de proliferación de la célula blanco, cuanto mayor sea el nivel de proliferación, el “silenciamiento” durará menos tiempo.

Vectores de introducción del ARN en la célula

Si lo que se desea es utilizar ARNsh o miARN, entonces hay que seguir otra estrategia. Primero hay que fabricar un fragmento de ADN a partir del cual se logre sintetizar el ARNsh o el miARN. Para poder introducirlo en la célula y que pueda producirse a partir de la maquinaria celular, se requiere de un vector que generalmente será un plásmido diseñado para este propósito.

Una de las ventajas de ésta estrategia es que se consigue seleccionar las células en las cuales el vector se integre al genoma de la célula; en este caso todas las células hijas tendrán integrado el vector y, por lo tanto, dicha población de células estará permanentemente silenciada.

Otro elemento importante a considerar es el mecanismo para introducir el ARNsi. Aquí también hay diferencias fundamentales entre organismos. Por ejemplo, en insectos es posible simplemente sumergir al organismo en una solución con el ARN de doble hebra y este penetrará en la célula, porque en los insectos existen transportadores de ARN de doble hebra (moléculas que permiten tomar el ARN del medio extracelular e introducirlo en la célula). En el caso del nematodo *C. elegans* se alimenta al gusano con bacterias que produzcan el ARN de doble hebra. Otra estrategia es la de microinyectar a la célula, sin embargo, esta técnica es muy especializada (requiere el uso de una aguja extremadamente delgada para inyectar el ARN de doble hebra en el citoplasma celular).

En los vertebrados la técnica, comúnmente, más utilizada es la transfección de células que consiste en introducir material genético en el interior de una célula eucariota. La lipofección significa transfección utilizando lípidos. En el mercado existe una gran cantidad de lípidos que se utilizan para introducir ADN o ARN. Los ARNsi pueden ser transfecta-

dos usando reactivos basados en lípidos catiónicos o poliaminas (RNAiFect de Qiagen, Oligofectamine de Invitrogen, siPORT NeoFX de Ambion). Este método es eficiente en el caso de células inmortalizadas adherentes, pero no para células en suspensión y recién purificadas (cultivos primarios). El método de elección en este último caso es la electroporación (*electroporation*), la cual consiste en la apertura de poros en la membrana celular, mediante la aplicación de pulsos eléctricos. Este procedimiento puede comprometer severamente la viabilidad celular y se recomienda optimizar las condiciones del procedimiento, para evitar un alto grado de muerte celular. Por lo general, esto se logra siguiendo las recomendaciones de las compañías que ofrecen los aparatos y/o amortiguadores para electroporación.

Otra alternativa a la lipofección es el uso de vectores de origen viral que permitan introducir el ARNsh a la célula blanco.

A diferencia de la transfección, con un vector viral es posible alcanzar eficiencias del 100 % (infectar todas las células). Se han desarrollado varios vectores virales, en particular derivados de adenovirus, retrovirus y lentivirus. Una segunda ventaja de los vectores virales es que permiten ser utilizados en organismos completos, lo cual es indispensable cuando se piensa en el potencial terapéutico del mecanismo de interferencia del ARN.

Para incrementar la duración del silenciamiento por ARN se desarrollaron vectores de expresión que contienen promotores de la ARN polimerasa, para la transcripción de ARNsi dentro de la propia célula. Los vectores de expresión son derivados plasmídicos o de virus que son introducidos a las células de manera estable y son transmitidos a través de varias generaciones.

Los elementos importantes de un vector de expresión son: el tipo de promotor (que permite expresarlo en procarionotas o en eucariotas), un sitio de inserción (clonado) de los ARN pequeños, presencia de marcadores (por ejemplo, la proteína verde fluorescente o GFP *Green fluorescence protein*) o bien genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, la neomicina), que permitan la selección de las células blanco que contengan el vector. En algunos casos, se puede utilizar un sistema denominado condicionado o inducible en el cual el vector contiene un promotor que requiere de la presencia de un antibiótico para inducir la expresión del ARNsh. Los vectores de expresión plasmídicos son introducidos a las células mediante sistemas basados en lípidos o poliaminas o bien por electroporación.

Los vectores de expresión virales son vehículos efectivos para la expresión estable de los ARNsh por su posibilidad de integrarse al genoma de la célula blanco [15,16]. Cuando estos vectores son empaquetados dentro de pseudopartículas virales, es posible introducirlos prácticamente a cualquier tipo de célula mediante infección. Dos tipos de vectores han sido desarrollados: los vectores derivados de oncorretrovirus o retrovirales desarrollados a partir del virus Moloney de la leucemia murina (*Moloney murine leukemia virus, MMLV*) o bien a partir del virus de células madre muri-

nas (*murine stem cell virus, MSCV*); y los vectores lentivirales desarrollados a partir del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (*human immunodeficiency virus-1, HIV-1*), que también pertenecen a la familia de los retrovirus. Una diferencia importante entre ellos radica en que los vectores retrovirales sólo infectan células dividiéndose activamente por mitosis, a diferencia de los vectores lentivirales que son capaces de infectar células con y sin actividad mitótica [17,18].

Existen varias compañías que ofrecen sistemas retro y lentivirales (Clontech, www.clontech.com; Invitrogen, www.invitrogen.com; System Biosciences SBI, www.systembio.com, etc.). La información necesaria para desarrollar dichos sistemas se encuentra en el manual del usuario de la compañía. Merece especial relevancia que el manejo de vectores virales requiere el uso de medidas de bioseguridad nivel 2, siendo necesario verificar los estatutos de bioseguridad aplicados al uso de lentivirus o retrovirus de la institución donde se trabaje.

Diseño de ARNsi y ARNsh

El mecanismo de interferencia de ARN resulta fácilmente utilizable por los laboratorios, ya que los programas para su diseño y producción, se encuentran disponibles sin costo. Actualmente existen compañías que tienen disponibles ARNsi contra virtualmente todo el genoma de algunos organismos (por ejemplo humano y ratón).

Los ARNsi son fáciles de usar [14], la desventaja es el corto tiempo de duración del silenciamiento y que no resulta fácil introducirlos en células como los cultivos primarios.

El primer paso en la selección del ARNsi comienza con el conocimiento de la secuencia del ARNm del gen de interés y la selección del programa para el diseño de la hebra sentido y anti-sentido del ARNsi (que formarán el "dúplex"). Los programas disponibles constan de algoritmos basados en las características comunes de los ARNsi. Algunos programas incluyen algoritmos que consideran la estructura secundaria y accesibilidad del ARNm blanco.

En el diseño se busca efectividad, estabilidad y especificidad de los ARNsi. Lo anterior incluye evitar la activación de la respuesta inmune innata mediada por receptores tipo Toll (TLRs), la activación de la respuesta mediada por interferones y el compromiso de los ARNm de genes no relacionados (*off targets*). Entre las características comunes que comparten los ARNsi efectivos y estables se encuentran: tamaño del ARNsi dúplex, secuencia asimétrica del ARNsh dúplex, localización preferencial de nucleótidos y estabilidad termodinámica.

El diseño de ARNsh y ARNsi efectivos y estables se basa en las características comunes de estas moléculas funcionales estudiadas. Algunas modificaciones químicas adicionales de los ARNsh han sido utilizadas para incrementar la resistencia de los mismos a la degradación *in vivo*. La adición de 2'-O-metilpurinas o 2'-O-fluoropirimidinas en la posición 2' de la ribosa incrementa la resistencia a la acción de ribonucleasas [19]. Los ARNsh modificados con 2'-O-metil-

purinas son más efectivos que sus análogos no modificados en la protección contra el virus de la hepatitis B, *in vivo* [20]. Los ARNsh han demostrado inducir la respuesta del interferón mediante la activación del sistema inmune innato y pueden inducir citocinas proinflamatorias. Se han identificado modificaciones químicas que impiden que el ARNsi induzca esta respuesta inmune. La adición de 2'-O-metilpurinas en la hebra sentido de un ARNsh dúplex elimina la activación de los TLRs [21] y previene la activación del IFN.

Sin embargo, se debe prestar especial atención al diseñar estos ARNsh modificados químicamente, ya que ciertas modificaciones pueden inhibir al ARNsh de integrarse adecuadamente en el complejo RISC, lo que resulta en la pérdida de orientación hacia el ARNm blanco. En el caso de los ARNsh, se recomienda usar la menor concentración posible que produzca un efecto terapéutico aceptable, para disminuir el riesgo de la saturación de los mecanismos endógenos de silenciamiento.

Modificaciones químicas artificiales son frecuentemente incluidas en el diseño de los ARNsh con la finalidad de incrementar su estabilidad sin afectar su efectividad.

Se deben tener en cuenta varios criterios para el diseño de ARNsi que se pueden consultar en http://www.Ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html. En primer lugar el análisis y la selección de las secuencias nucleotídicas de ADN a silenciar. La longitud de los ARNsi no debe exceder de 21 a 25 nucleótidos. Se debe evitar en lo posible la formación de estructuras secundarias en la secuencia del ARNm que complementará con el ARNsi. Analizando la homología de secuencias de los ARNsi, éstos pueden compartir una mínima identidad con otros genes. Los ARNsi sintéticos deben ser de doble cadena (*dsRNA*) para favorecer el acoplamiento con el complejo RISC y con el ARNm específico.

Existen consideraciones que pueden favorecer la eficacia de los ARNsi para silenciar de manera selectiva y específica la expresión de genes blanco.

Una vez diseñadas, la síntesis química de la hebra sentido y anti-sentido puede ser ordenada a diferentes compañías: Dharmacon, www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenter_Page.aspx; Ambion www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html; Qiagen www.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner; Invitrogen rnaidesigner.invitrogen.com/maexpress/; Integrated DNA Technologies www.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx; Sfold Algorithm sfold.wadsworth.org/sirna.pl; Tuschl Lab www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html; SDS (siRNA Design Software) i.cs.hku.hk/ffsirna/software/sirna.php; etc.

Generalmente se ordena la síntesis de oligonucleótidos de-salinizados (*desalted purified oligonucleotides*), a una concentración de 50-100 nM. Una vez recibidos, se requiere hibridar ambos oligonucleótidos para formar el ARN de doble hebra (dúplex) e introducirlos en la célula de interés.

Varias compañías ofrecen el diseño y la síntesis de ARNsh listos para ser transfectados e incluso la garantía de obtención de 50-70 % de silenciamiento (Dharmacon,

“SMARTpool reagent” www.dharmacon.com/sigenome; Ambion, “Silencer pre-designed siRNAs/Validated siRNAs” www.ambion.com/RNAi].

Cuantificación del efecto del ARN de interferencia. Controles

El grado de silenciamiento se determina midiendo la disminución de los niveles del ARNm blanco, o bien, la disminución de los niveles de la proteína blanco. El silenciamiento se considera válido cuando ocurre una disminución sustancial de los niveles de expresión del gen de interés, mientras que no existe disminución alguna en la expresión de un gen control.

La *PCR* en tiempo real es el método de elección para medir los niveles del ARNm. Este método sensible y cuantitativo mide los niveles del ARNm blanco en las células transfectadas / infectadas con el ARNsi / ARNsh de interés y los compara con los niveles del ARNm blanco en las células transfectadas / infectadas con el ARNsi control. Además, este método requiere de la determinación de los niveles de ARNm de un gen constitutivo (tubulina, actina, etc.), el cual funciona como gen control cuya expresión no debe ser afectada. Compañías como Ambion y Applied Biosystem ofrecen los oligonucleótidos o *primers* (www.ambion.com/RNAi) con garantía de funcionamiento.

Para medir el grado de silenciamiento a nivel proteico, existen varios métodos como el *Western blot*, la inmunofluorescencia y la citometría de flujo. Todos son métodos perfectamente estandarizados y de uso común en el laboratorio. Un control negativo para ARNsi o para ARNsh no presenta ninguna secuencia complementaria al ARNm existente en el organismo de interés. Este debe ser utilizado para descartar efectos no específicos en la expresión del gen blanco, causado por el procedimiento de introducción de ARNsi / ARNsh. El control negativo debe ser utilizado en cada experimento realizado y debe usarse para comparar los niveles de silenciamiento del gen blanco. Varias compañías ofrecen controles negativos de ARNsi / ARNsh (Qiagen, www.qiagen.com/GeneGlobe/siRna-ControlView; Ambion, www.ambion.com/RNAi).

Se recomienda el uso de un control positivo para verificar las condiciones óptimas de la transfección o infección. Éste resulta muy importante en el caso de los ARNsi, puesto que podría ser la única manera de verificar que la eficiencia de la transfección sea suficiente para observar el efecto de silenciamiento. Un control positivo ARNsi / ARNsh presenta una secuencia complementaria al ARNm de un gen constitutivo en la célula de interés.

Aplicaciones

Entre las aplicaciones del ARNi se pueden considerar los usos que tiene como herramienta en la investigación básica, así como en el desarrollo de agentes terapéuticos. Existe una relación estrecha entre la investigación básica y el área clínica. La investigación básica permite el descubrimiento de los mecanismos o factores responsables de alguna en-

fermedad, proporcionando no sólo los posibles blancos para una terapéutica, sino también las herramientas para el desarrollo de la misma. El área clínica proporciona la experiencia y conocimientos para el diagnóstico de enfermedades y la capacidad para aplicar tratamientos a seres humanos.

Ejemplos del uso en el laboratorio del ARNsh

El inhibidor secretorio de la proteasa leucocitaria (*SLPI*) es una molécula que se estudia desde hace varios años en el laboratorio y se encontró que tiene implicancia en el desarrollo del cáncer y la diseminación de metástasis en varios tipos de tumores. Para estudiar el efecto de *SLPI* en tumores mamarios, se realizaron experimentos de apoptosis celular *in vitro* y experimentos de crecimiento tumoral *in vivo*.

La técnica de transfección génica en líneas celulares mamarias permitió la obtención de clones que sobreexpresaron *SLPI*. El ARNsi para *SLPI* fue sintetizado por Invitrogen Corporation (Invitrogen). Las células control fueron tratadas con el dúplex de ARNsi de secuencia entremezclada (*scramble*) diseñado según las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Se realizaron búsquedas en la base de datos del genoma humano BLAST para asegurar que las secuencias no se encontraran en otros transcritos de genes. El silenciamiento de genes se comprobó usando un ensayo ELISA *sándwich*, después de la transfección para medir la proteína *SLPI*. Las células que sobreexpresaban *SLPI* se sembraron en placas y se incubaron durante 24 hs, luego se transfectaron con 50 pmol de ARNi usando LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), siguiendo los manuales de procedimientos proporcionados por los fabricantes. El cultivo *in vitro* de líneas celulares de tumores mamarios tratados con *SLPI* y los clones productores de *SLPI* fueron más propensos a la apoptosis que las células control. *SLPI* induce la apoptosis de las células tumorales mamarias *in vitro*. La administración de células de tumor mamario murino que sobreexpresaban altos niveles de *SLPI* no desarrollaron tumores en ratones [22]. Con estos experimentos, se puede concluir que la molécula de *SLPI* puede ser considerada una nueva herramienta terapéutica potencial para ciertos tumores, como los mamarios.

En otra serie de experimentos en que se utilizan líneas celulares mamarias se estudió la relación entre *SLPI* y la cadherina epitelial (E-cadherina). La misma está implicada en la adhesión célula-célula a través de su dominio extracelular, mientras que el dominio intracelular interactúa con proteínas adaptadoras, es decir, la catenina, que conecta a la E-cadherina con el citoesqueleto de actina y participa en eventos de transducción de señales. Los resultados obtenidos con las células transfectadas con *SLPI* indican que la expresión de esta molécula da como resultado una regulación negativa de la E-cadherina. Para confirmar esta asociación, se incubaron células transfectadas con *SLPI* con un ARNsh específico para *hSLPI* (*siSLPI*) o con un ARNsh de codificación entremezclada (*scramble*) y los niveles de ARNm de E-cadherina se evaluaron mediante *PCR* cuantitativa. La efectividad del tratamiento con ARNsh en la expresión de

SLPI se confirmó por la disminución de los niveles de la proteína secretada por *SLPI* presente en el ELISA. Los niveles de expresión de ARNm para E-cadherina fueron mayores en el clon productor de *SLPI* en comparación con el control utilizando ARNsh [23].

Tratamiento de enfermedades

Sistemas de liberación del ARNsi / ARNsh *in vivo*

Los métodos de liberación desarrollados *in vivo* incluyen la inoculación directa del ARNsi en órganos como el ojo, pulmón y sistema nervioso central, o bien, la liberación sistémica de ARNsi conjugados a lípidos, polímeros, anticuerpos y nanopartículas.

La liberación directa de ARNsi (en vehículos como solución salina o dextrosa 5 %) es relativamente fácil y requiere de bajas concentraciones por lo que resulta muy atractiva como tratamiento local, pero no es útil para un tratamiento sistémico. Este método ha sido utilizado con éxito para liberar ARNsi en ojo [24,25] y pulmón [26].

La liberación sistémica-no-específica de ARNsi involucra la inyección intravenosa de ARNsi modificados químicamente, conjugados a colesterol o encapsulados en bicapas lipídicas, conocidas como partículas lipídicas-ácido nucleico estables (SNALPs), los cuales entran en la célula por endocitosis. Estos dos métodos han sido usados con éxito para liberar los ARNsi en hígado e intestino delgado [27, 28] pero no son apropiados para otro tipo de órganos o tejidos.

La alternativa son los métodos de liberación sistémica específica, dirigida a un órgano o tejido particular, los cuales involucran el uso de ARNsi encapsulados en nanopartículas catiónicas conjugadas a ligandos o receptores específicos [29], unidos al complejo anticuerpos-protamina [30] y fusionados a aptámeros de ARN [31]. Como ejemplo, el ARNsi dirigido contra el producto del gen EWS-FLI1 en un modelo murino de sarcoma metastático fue protegido con nanopartículas compuestas por ciclodextrina (un oligosacárido cíclico), conteniendo policationes y cubiertas con transferrina, cuyo receptor es expresado en grandes cantidades en las células cancerosas. El tratamiento inhibió considerablemente el crecimiento tumoral [29].

Los vectores lentivirales han sido usados exitosamente para la liberación de ARNsh en mamíferos: como por ejemplo su uso contra la forma activada del oncogen Ras en ratones, para disminuir el crecimiento de células tumorales [32]. Vectores adenovirales han sido usados para liberar ARNsh al sistema nervioso central, tomando ventaja de la atracción natural del adenovirus hacia las neuronas. Por ejemplo, un ARNsh dirigido contra el gen de la Huntingtina (el gen mutado causante de la enfermedad de Huntington) fue insertado en un vector adenoviral y usado con éxito en modelos murinos [33]. Es necesario advertir que a pesar de las ventajas que ofrece el uso de vectores virales, existe el riesgo potencial de que algunos de ellos estimulen una respuesta inmunológica por sí mismos. Por otro lado, la naturaleza viral de estos vectores los hace susceptibles de sufrir mutaciones,

lo cual podría provocar potencialmente una expresión génica alterada.

Pruebas clínicas en humanos

Los ARNsi deben pasar por ensayos preclínicos evaluando el producto en animales modelo en los que se investiga cómo se distribuyen en el organismo, y cuáles son sus efectos positivos y negativos. Si esta etapa se supera con éxito, comenzarán los ensayos clínicos con personas voluntarias. Entre ellos se distinguen distintas fases para evaluar la seguridad y farmacocinética, dosis óptima, la efectividad para el tratamiento de la enfermedad en estudio, y los efectos adversos o no deseados. En función de los resultados, la droga es aprobada o no para su uso como medicamento en seres humanos. En teoría, el ARNi podría ser aplicado como tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión o sobre-expresión de un gen conocido. El efecto esperado es detener o disminuir el mecanismo generador de la enfermedad, produciendo efectos secundarios tolerables o bien ninguno.

Así pues, la investigación básica ha señalado como posibles blancos para terapia a productos de genes involucrados en el ciclo celular, apoptosis, motilidad celular, transducción de señales, estrés oxidativo, desarrollo, etc. Lo anterior dio lugar a estudios pre-clínicos en modelos murinos y en primates no-humanos que incluyen el tratamiento de infecciones virales [26,34] enfermedades oculares [24,25], desórdenes neurodegenerativos [35,36], cáncer [29,37] e infecciones por VIH [38]. Más aún, los avances logrados en dichos estudios ya fueron trasladados al campo de las pruebas clínicas en humanos.

Durante la última década, la interferencia de ARN se ha utilizado de forma ubicua para estudiar la función biológica *in vitro*; sin embargo, las limitaciones se asociaron con su utilidad *in vivo*.

Más recientemente, las pequeñas nanopartículas de ARNi con biocompatibilidad mejorada han ganado prevalencia como una opción terapéutica potencial para el tratamiento de diversas enfermedades.

Los ARNsi pueden ser transportados en nanopartículas orgánicas. Las nanopartículas lipídicas incluyen las micelas y los liposomas, los cuales están compuestos de lípidos hidrofóbicos que presentan una cabeza hidrofílica. Las nanopartículas encapsulan fármacos dentro de un núcleo, esencialmente aumentando su solubilidad, protegiéndolas de la degradación, y la prevención de su liberación prematura en el torrente sanguíneo [39].

La adaptabilidad de las nanopartículas de ARNsi permite la biodisponibilidad de estas moléculas, lo que es especialmente ventajoso para aplicaciones terapéuticas en enfermedades heterogéneas que carecen de características moleculares unificadoras, como el cáncer de mama triple negativo que es un subtipo agresivo. Existen desafíos en curso en el campo de la investigación de nanopartículas de ARNsi que, si se abordan, mejorarían significativamente la eficacia de las nanopartículas como una opción terapéutica

para el tratamiento del cáncer [40].

Ha sido informado el uso de ARNsi en ensayos clínicos que involucran enfermedades como degeneración macular relacionada con la edad (*age-related macular degeneration*, DMAE), edema macular diabético (*diabetic macular edema*, DME), glaucoma, hipercolesterolemia y tumor sólido humano (*melanoma*).

También se ha demostrado que las nanopartículas de ARNsi son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral [41,42], la metástasis [41,42], la angiogénesis [43,44], la resistencia a fármacos [42,45] y la infección respiratoria neonatal producida por el virus sincicial respiratorio (RSV). Estos estudios han allanado el camino para varios ensayos clínicos en curso. También se ha probado en el tratamiento de linfoma en pacientes con VIH usando ARNsh-vector viral contra los exones tat y rev del VIH. En este estudio, células pluripotenciales infectadas con el ARNsh-vector lentiviral han sido transplantadas en cuatro pacientes [14].

La interferencia de ARN puede mejorar el efecto terapéutico de los quimioterápicos, y también puede ser utilizada para superar los efectos de la resistencia adquirida por las células cancerosas [46]. Li y col. sintetizaron un polímero catiónico para formar complejo con el ARNi [47]. El objetivo fue la inhibición de la resistencia a fármacos múltiples (MDR) mediante el silenciamiento de la expresión de Mdr-1 y survivina, un miembro de la familia de moléculas inhibitorias de la apoptosis. El silenciamiento de estos dos genes permitió aumentar la eficacia terapéutica de la doxorrubicina en células de cáncer de mama MCF-7 resistentes al fármaco. La captación de doxorrubicina en estas células aumento 15 veces. En un modelo murino de cáncer de mama como la línea celular MCF-7 resistente a la doxorrubicina, las nanopartículas dieron como resultado una mejora en la eficacia [48].

La rapidez de estos avances puede deberse a que las compañías farmacéuticas han decidido unir esfuerzos para el desarrollo de terapias basadas en el ARNi para diversas enfermedades y hoy en día la colaboración parece ser la práctica común en este campo.

Oligonucleótidos antisentido (antisense oligonucleotides, ASO)

Actualmente hay dos enfoques principales utilizados que tienen al ARN como objetivo: ARN bicatenario de interferencia y los oligonucleótidos antisentido (*antisense oligonucleotides*, ASO). Hablando en términos generales, el ARNi opera secuencialmente y post-transcripcionalmente mediante la activación de ribonucleasas que, junto con otras enzimas y complejos, degradan de forma coordinada el ARN después de cortarlo en pedazos más pequeños [49]. Los oligonucleótidos antisentido se unen a su ácido nucleico diana a través de un alineamiento de bases de Watson-Crick, e inhiben o alteran la expresión génica a través de impedimento estérico, alteraciones de empalme, iniciación de la degradación u otros eventos. Los ASOs se unen a los

ARNm y forman una estructura que es reconocida por la ARNasa H resultando en la ruptura del ARN blanco [50].

Ambos enfoques están siendo evaluados en ensayos clínicos para la selección de ARNs involucrados en diversas enfermedades, tales como la neurodegeneración. Las ventajas de los ASO incluyen mayor afinidad debido al desarrollo de modificaciones químicas que aumentan la afinidad y la selectividad disminuyendo la toxicidad. De hecho, los ASO empleados en el tratamiento de la atrofia muscular espinal, la esclerosis lateral amiotrófica [51] y la distrofia muscular de Duchenne (*Duchenne muscular dystrophy*, DMD) [52] han mostrado resultados positivos en ensayos clínicos.

También hay algunas compañías con fármacos basados en ARNsi que son prometedores, tales como "Arrowhead" que está usando el fármaco como agente terapéutico para la infección crónica por Hepatitis B, así como otras dolencias tales como enfermedades cardiovasculares, enfermedad de células claras y carcinoma de células renales. Los resultados clínicos de fase II para el fármaco basado en ARNsi para la hepatitis B han sido muy positivos. Además, "Alnylam Pharmaceuticals" es otra compañía que emplea al ARNi para tratar enfermedades genéticas, enfermedades cardio-metabólicas y enfermedades infecciosas hepáticas. De hecho, dos de estos fármacos dirigidos a la amiloidosis hereditaria se han convertido en ensayos clínicos de fase III, lo que sugiere su proximidad a la llegada al mercado. Wittrup, Lieberman y Chery proporcionan revisiones detalladas de los esfuerzos para llevar el silenciamiento por ARN a la clínica [53,54].

Consideraciones de los tratamientos con ARNi

El efecto de los ARNsi es transitorio. El tratamiento con ARNsi puede ser detenido en cualquier momento al suspender su administración. Por otro lado, el ARNsh en un vector viral, es sintetizado constantemente dentro del organismo infectado, produciendo un silenciamiento prolongado. El ARNsh puede ser liberado efectivamente en la célula o tejido blanco, al usar vectores provenientes de virus con receptores específicos para tales blancos. Una desventaja es que el tratamiento no puede ser detenido, ya que el ARNsh-vector viral permanecerá dentro del organismo a lo largo de su vida.

A pesar del tremendo potencial de las terapias basadas en ARN, también hay desafíos a tener en cuenta. Por ejemplo, los ARN son intrínsecamente inestables y, por lo tanto, difíciles de administrar en cantidades suficientemente altas al tejido diana debido a la depuración del sistema renal y a la degradación por nucleasas en el torrente sanguíneo [50,55]. Los ARNsi pueden ser degradados por ribonucleasas endógenas en su camino a la célula o tejido blanco, por lo que se requiere del uso de ARNsi particularmente resistentes o estables. Además, la toxicidad y la activación del sistema inmunológico son también preocupaciones apremiantes [55,56]. Se debe evitar la activación de la respuesta inmune mediada por interferones o por TLRs, hecho particularmente importante cuando se administran los ARNsi a

un mamífero. La administración segura de los ARNsi / ARNsh debe ser verificada rigurosamente, lo cual incluye el uso de vehículos de liberación de ARNsi no tóxicos.

Conclusiones

La interferencia de ARN ha demostrado su enorme potencial en Medicina, lo que se refleja en el creciente número de artículos científicos que la refieren como estrategia experimental y que permiten haber desarrollado tratamientos clínicos en humanos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Referencias bibliográficas

- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell*. 1990;2(4):279-89.
- Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*. 1992;6(22):3343-53.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(17):9742-7.
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Friendewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal*. 2002;21(21):5864-74.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, y col. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature structural & molecular biology*. 2005(4):340-9.
- Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2013(2):100-12.
- Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):405-12. PubMed PMID: 19158786.
- Sánchez ML. MicroARNs en Inmunología. *Revista Bioquímica y Patología Clínica*. 2014;78(2):40-62.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & development*. 1999(24):3191-7.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*. 2001(2):188-200.
- Ortiz-Quintero B. ARN de interferencia: desde sus orígenes a una nueva herramienta para el silenciamiento génico. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*. 2009;61(5):412-27.
- Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(23):14943-5.
- Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC biotechnology*. 2002;2:15.
- Naldini L, Blomer U, Galloway P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, y col. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7.
- Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Molecular and cellular biology*. 1990(8):4239-42.
- Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, y col. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic acids research*. 2003;31(11):2705-16.
- Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, y col. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nature biotechnology*. 2005(8):1002-7.
- Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007(9):1663-9.
- Amiano NO, Costa MJ, Reiteri RM, Payes C, Guerrieri D, Tateosian NL, y col. Anti-tumor effect of SLPI on mammary but not colon tumor growth. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(2):469-75.
- Rosso M, Lapyckyj L, Amiano N, Besso MJ, Sanchez M, Chuluyan E, y col. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) expression downregulates E-cadherin, induces beta-catenin re-localisation and triggers apoptosis-related events in breast cancer cells. *Biology of the cell*. 2014(9):308-22.
- Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y, y col. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene therapy*. 2006;13(3):225-34.
- Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, Ying GS, Wu IH, Malik G, y col. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina*. 2004;24(1):132-8.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature medicine*. 2005;11(1):50-5.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, y col. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*

- ture. 2004;432(7014):173-8.
28. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, y col. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006;441(7089):111-4.
 29. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer research*. 2005;65(19):8984-92.
 30. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, y col. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nature biotechnology*. 2005;23(6):709-17.
 31. McNamara JO, 2nd, Andreck ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, y col. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nature biotechnology*. 2006;24(8):1005-15.
 32. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer cell*. 2002;2(3):243-7.
 33. Huang B, Schiefer J, Sass C, Landwehrmeyer GB, Kosinski CM, Kochanek S. High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo. *Human gene therapy*. 2007;18(4):303-11.
 34. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, y col. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*. 2006;439(7072):89-94.
 35. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, y col. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nature medicine*. 2005;11(4):423-8.
 36. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, y col. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nature medicine*. 2004;10(8):816-20.
 37. Landen CN, Jr., Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, et al. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer research*. 2005;65(15):6910-8.
 38. Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, y col. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*. 2008;134(4):577-86. PubMed PMID: 18691745.
 39. Mattheolabakis G, Rigas B, Constantinides PP. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine*. 2012;7(10):1577-90.
 40. Parvani JG, Jackson MW. Silencing the roadblocks to effective triple-negative breast cancer treatments by siRNA nanoparticles. *Endocrine-related cancer*. 2017;24(4):R81-R97.
 41. Parvani JG, Gujrati MD, Mack MA, Schiemann WP, Lu ZR. Silencing beta3 Integrin by Targeted ECO/siRNA Nanoparticles Inhibits EMT and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer research*. 2015;75(11):2316-25. PubMed PMID: 25858145.
 42. Zhang X, Wang Q, Qin L, Fu H, Fang Y, Han B, et al. EGF-modified mPEG-PLGA-PLL nanoparticle for delivering doxorubicin combined with Bcl-2 siRNA as a potential treatment strategy for lung cancer. *Drug delivery*. 2016;23(8):2936-45.
 43. Liu JY, Chiang T, Liu CH, Chern GG, Lin TT, Gao DY, y col. Delivery of siRNA Using CXCR4-targeted Nanoparticles Modulates Tumor Microenvironment and Achieves a Potent Antitumor Response in Liver Cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015;23(11):1772-82.
 44. Malamas AS, Jin E, Gujrati M, Lu ZR. Dynamic Contrast Enhanced MRI Assessing the Antiangiogenic Effect of Silencing HIF-1alpha with Targeted Multifunctional ECO/siRNA Nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*. 2016;13(7):2497-506.
 45. Deng ZJ, Morton SW, Ben-Akiva E, Dreaden EC, Shopsowitz KE, Hammond PT. Layer-by-layer nanoparticles for systemic codelivery of an anticancer drug and siRNA for potential triple-negative breast cancer treatment. *ACS nano*. 2013;7(11):9571-84.
 46. Gao Z, Zhang L, Sun Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;162(1):45-55.
 47. Yin Q, Shen J, Chen L, Zhang Z, Gu W, Li Y. Overcoming multidrug resistance by co-delivery of Mdr-1 and survivin-targeting RNA with reduction-responsible cationic poly(beta-amino esters). *Biomaterials*. 2012;33(27):6495-506.
 48. Blanco E, Ferrari M. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. *Breast*. 2014;23(1):10-8.
 49. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2003 Dec;67(4):657-85.
 50. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*. 2012;19(1):60-71.
 51. Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:90-103.
 52. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(2):125-40.
 53. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nature reviews Genetics*. 2015;16(9):543-52.
 54. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*. 2016;4(7):35-50.
 55. Moreno PM, Pego AP. Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:87.
 56. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(5):329-40.