

# Bioquímica

Bioquímica  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica  
ambcli@prodigy.net.mx  
ISSN (Versión impresa): 0185-5751  
MÉXICO

2005  
Jorge Luis Hernández García  
ARN DE INTERFERENCIA Y SU IMPORTANCIA EN LA BIOMEDICINA  
MOLECULAR  
*Bioquímica*, octubre-diciembre, año/vol. 30, número 004  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica  
Distrito Federal, México  
pp. 118-127

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

reDalyc  
LA HEMEROTECA CIENTÍFICA EN LÍNEA

The logo for reDalyc features the text 'reDalyc' in a stylized font, with a red arrow pointing from the 'y' towards the top right. Below the text, it says 'LA HEMEROTECA CIENTÍFICA EN LÍNEA'.

# ARN de interferencia y su importancia en la biomedicina molecular

Jorge Luis Hernández-García\*

## RESUMEN

El ARN de interferencia (ARNi) es una conservada respuesta biológica a la presencia de ARN de doble cadena, lo cual origina el silenciamiento específico de secuencia de un gen determinado. El esfuerzo exhaustivo en la investigación durante los últimos 5 años ha facilitado la colocación acelerada del ARNi de un fenómeno biológico desconocido a una herramienta valiosa utilizada en el silenciamiento de la expresión genética y en monitoreos genómicos funcionales a gran escala. Con esta tecnología, trabajos recientes han demostrado éxito en el potencial terapéutico del ARNi para tratar diversas enfermedades. Sin embargo, para incrementar estas aplicaciones y la apreciación en el futuro del ARNi tanto en la investigación básica como el tratamiento de desórdenes causados por expresiones genéticas aberrantes, es importante poseer un entendimiento del proceso del ARNi y sus limitaciones.

**Palabras clave:** ARN de interferencia, Dicer, Drosha, ARNip, miARN, DGCR8, RISC, miRNP.

## ABSTRACT

*ARN interference (RNAi) is a conserved biological response to double-stranded RNA that results in the sequence-specific silencing of target gene expression. Over the past five years, and intensive research effort has facilitated the rapid movement of RNAi from a relatively obscure biological phenomenon to a valuable tool used to silence target gene expression and perform large-scale functional genomic screens. Also, with this unknown technology, recent studies have demonstrated success using the therapeutic potential of RNAi for treating important several disorders. However, in order to advance these applications and gain an appreciation for the future of RNAi both basic research and in the treatment of diseases caused by aberrant gene expression, its important to have an understanding of the process of RNAi and its limitations.*

**Key words:** RNA interference, Dicer, Drosha, siRNA, miRNA, DGCR8, RISC, miRNP.

## INTRODUCCIÓN

El silenciamiento genético es un proceso sumamente importante en la mayoría de los organismos. Si una célula expresara todos y cada uno de sus genes sin una cierta regulación, el desorden generado en el interior de la misma podría conducir inclusive al frenado total de las funciones metabólicas, lo que conllevaría a una muerte celular inevitable. Para evitar este trágico incidente, la célula puede valerse del ARN de interferencia (ARNi), para inhibir y restringir la expresión de elementos genéticos no deseables.

Las primeras observaciones de este fenómeno se realizaron en organismos vegetales.<sup>1-4</sup> Con la finalidad de obtener petunias de un color púrpura más intenso que el de la flor silvestre, se adicionaron copias extra a las plantas del gen que codifica ese color. Para sorpresa de propios y extraños, las petunias transgénicas resultantes eran bicolor y algunas completamente blancas.<sup>5,6</sup> Lo que indicaba que no sólo los transgenes habían sido reprimidos sino también aquellos nativos de la planta.<sup>7</sup> A este fenómeno se le conoce actualmente como silenciamiento genético post-transcripcional (PTGS)<sup>8</sup> en organismos vegetales y supresión (*quelling*) en hongos.<sup>9</sup> Actualmente se sabe que este proceso se encuentra altamente conservado en una gran variedad de organismos eucarióticos.<sup>10-12</sup>

Durante mucho tiempo se trató de averiguar qué originaba el proceso de interferencia. Sin embargo, la primera descripción formal del ARNi como una respuesta biológica a la presencia de ARN de doble cadena (ARNdc) en la célula, fue descubierta en estudios realizados sobre el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, al cual se introdujeron moléculas de ARNdc del gen

\* Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana.

Correspondencia:  
Jorge Luis Hernández-García  
Av. Alejandro V. Humboldt Sur s/n  
Rest. El Golfo de México, 91270, Perote, Ver.  
e-mail: diablito\_guerrozo@yahoo.com.mx

Recibido: 16-05-2005  
Aceptado: 29-07-2005

*unc-22*, implicado en el proceso de contracción muscular.<sup>13-15</sup> El fenotipo observado fueron organismos con grandes espasmos, lo cual también afectaba a su progenie.<sup>16</sup> No obstante, determinar su presencia en mamíferos fue una tarea mucho más compleja debido a la respuesta del interferón,<sup>17</sup> cuya activación responde a la presencia de ARNdc generando la muerte celular a través de apoptosis.<sup>18</sup>

El mecanismo de acción del interferón se activa en presencia de ARNdc de más de 30 nucleótidos de longitud (nt). Esto induce la degradación no específica de todos los ARNm celulares por medio de la activación de la 2'-5' oligoadenilato sintetasa en ARNasa L. Así mismo el interferón excita a la proteína cinasa PKR, la cual fosforila e inactiva al factor de iniciación eucariótica (eIF2 $\alpha$ ) inhibiendo la traducción de los ARNm y por consiguiente la síntesis de proteínas.<sup>19, 20</sup> Fue hasta el año 2001 cuando se logró silenciar genes en células de mamífero sin despertar dicha respuesta, gracias a la utilización de ARNdc de 21 nt.<sup>21</sup> En la actualidad se ha demostrado que la utilización de ARNdc con una longitud de 27-29 nt incrementa en silenciamiento genético de manera potencial.<sup>22, 23</sup>

Hasta el momento los estudios realizados dan a entender que el ARNi mediado a través de ARNdc, es un proceso ancestral el cual precede la divergencia evolutiva de las plantas y los gusanos. Así mismo, se cree que funciona de manera natural en el silenciamiento de virus y elementos genéticos móviles que generan ARNdc intermediarios, los cuales son un tipo de ARN usualmente no producidos por las células.<sup>2</sup> El objetivo del presente trabajo es revisar el mecanismo del ARNi en células humanas, sus componentes principales y su ansiada participación en el campo de la biomedicina como herramienta terapéutica.

## MECANISMO

De acuerdo a su origen y función en células humanas, dos tipos de ARN pequeños disparan el mecanismo del ARNi. Por un lado, los ARN de interferencia pequeños (ARNip) y los ARN en horquilla pequeños (ARNhp), los cuales son producto del procesamiento de ARNdc largos sintetizados en laboratorio e introducidos a la célula; y por otro lado los microARN (miARN), originados de la transcripción de genes especiales localizados dentro del genoma de la propia célula y su procesamiento a partir de precursores.

Como se menciona anteriormente, los mecanismos de silenciamiento mediante ARNi fueron reconocidos en principio, o bien como mecanismo antivirales pro-

tegiendo a los organismos de virus de ARN<sup>24</sup> o previniendo la integración azarosa de elementos transponibles.<sup>25</sup> Sin embargo, el papel general del silenciamiento en la regulación de la expresión genética sólo se hizo aparente cuando se descubrieron los genes específicos que codificaban formas pequeñas de ARNdc en horquilla.<sup>26</sup> Muchos de estos miARN se encuentran evolutivamente conservados y su función principal es inhibir la traducción de los ARNm.

## Procesamiento de los ARNdc precursores a miARN

La maduración de los ARN pequeños es un proceso gradual catalizado mediante endonucleasas de tipo ARNasa III específicas de ARNdc, llamadas Drosha y Dicer, las cuales contienen dominios catalíticos y de unión a ARNdc (*Figuras 1 y 2*). Drosha es requerida específicamente para el procesamiento de precursores de miARN.<sup>25</sup> Típicamente, los miARN son derivados de largos transcritos primarios originados a partir de la ARN polimerasa II (Pol II),<sup>27</sup> que son procesados en el núcleo<sup>28-30</sup> mediante la ribonucleasa II Drosha junto con la proteína con dominio de unión a ARNdc, DGCR8.<sup>31</sup> Una vez que Drosha/DGCR8 escinden en horquilla el miARN primario (pri-miARN) recién transcrito, un remanente de 2 nt OH 3' y fosfato 5' permanecen en la base del tallo.<sup>29, 32</sup> Los miARN precursores (pre-miARN) resultantes de 70 nt son entonces exportados hacia el citoplasma mediante el factor de exportación nuclear, la Exportina-5.<sup>33-35</sup>

Ya en el citoplasma, los pre-miARN son ahora procesados por Dicer.<sup>36-40</sup> El procesamiento de los ARNdc mediante Dicer genera una molécula dúplex de ARN de 21 nt aproximadamente, es decir el miARN maduro, el cual posee de igual forma 2 nt sobresalientes.<sup>41, 42</sup> A diferencia de otros organismos, el procesamiento de los ARNdc dependiente de ATP no se ha observado en células humanas.

## Ensamble en los complejos proteicos efectores de ARNi

Posterior al procesamiento de los ARNdc a través de Dicer, los ARNip y los miARN ya maduros se ensamblan en grupos de partículas ribonucleoprotéicas o RNPs. Los cuales ya funcionales, contienen únicamente una sola cadena de ARNip o miARN, aquella que es homóloga o antisentido al ARNm objetivo.

Si bien, es difícil designar funciones distintivas, el complejo efector que monta en su estructura al ARNi es comúnmente referido como complejo silencia-

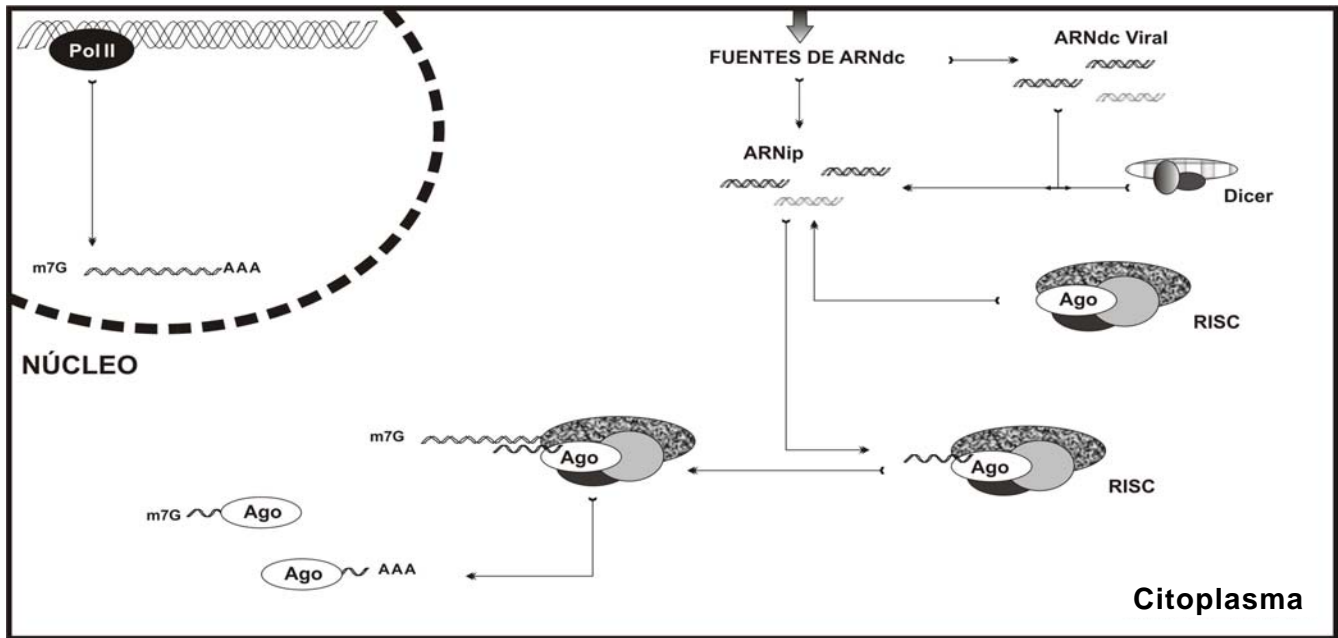


Figura 1. Modelo general del silenciamiento genético guiado por ARNip.

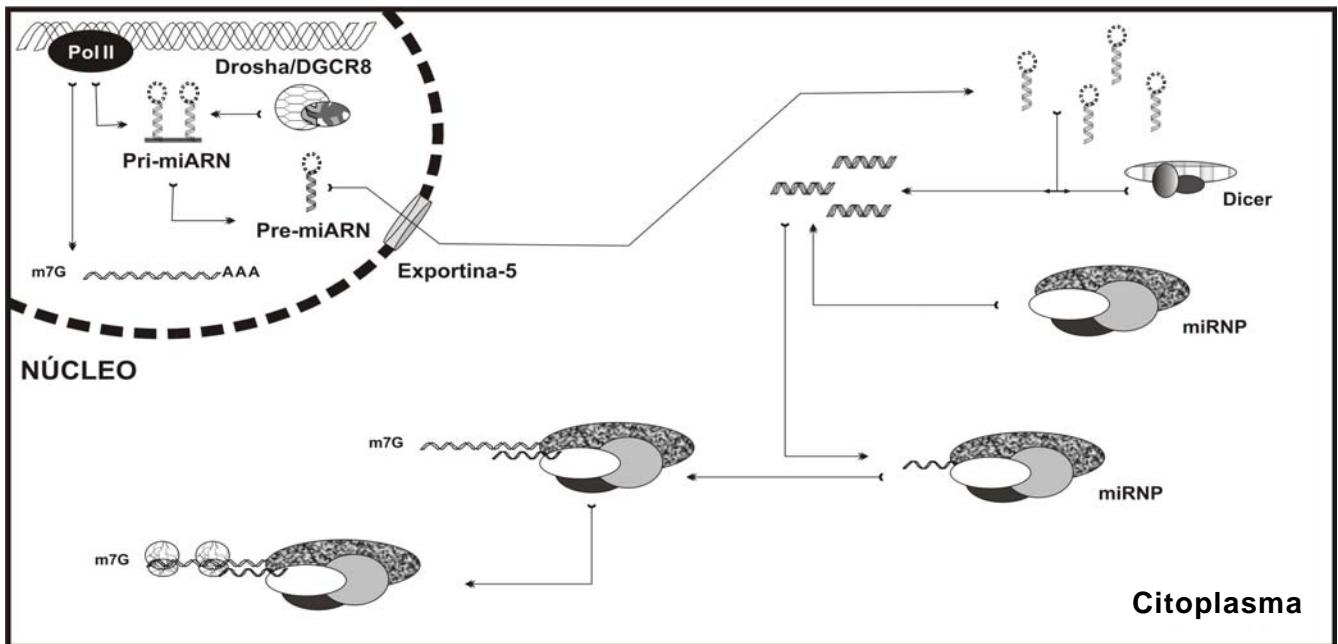
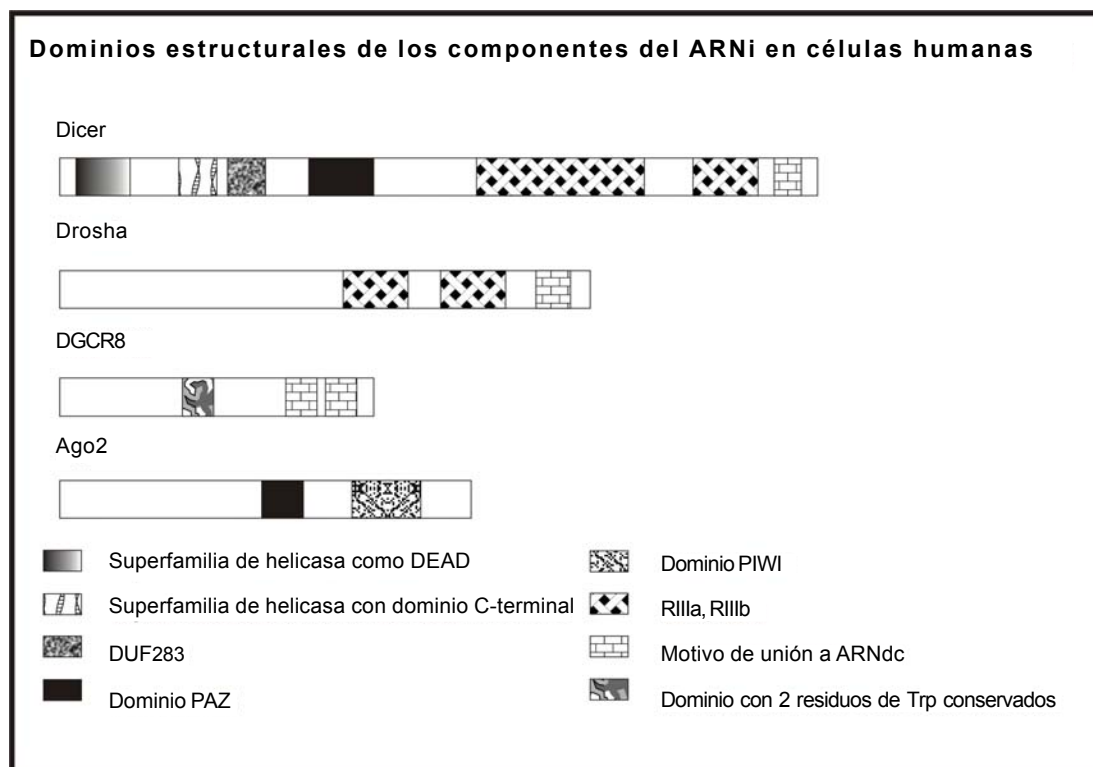


Figura 2. Modelo general de la represión traduccional guiada por miARN.

dor inducido por ARN (RISC),<sup>43</sup> mientras que el complejo efector que mantiene a un miARN se denomina complejo ribonucleoproteico (miRNP).<sup>44</sup> Cada RISC o miRNP contiene un miembro de la familia de las proteínas Argonata (Ago); las cuales probablemente se

unen al ARN de manera directa en estos complejos, sin embargo se requiere mayor evidencia.<sup>44-47</sup> El estimado aparente del peso molecular va de 130 a 160 kDa en el caso de RISC purificado con altas concentraciones de sal.<sup>46,48</sup>



**Figura 3.** Dominios estructurales de los componentes involucrados en el fenómeno del ARN de interferencia.

El ensamble de RISC y presumiblemente también el de los miRNP es dependiente de ATP,<sup>49,50</sup> lo cual puede reflejar el requerimiento energético en el desenrollamiento de los ARNip/miARN dúplex y/o algún cambio conformacional o composicional. Como ya se mencionó, la cadena que permanece montada es la cadena antisentido del ARNip/miARN, complementaria al gen objetivo,<sup>26,51,52</sup> propiamente su ARNm.

El ARNip/miARN de cadena sencilla (cs) que permanece en el RISC/miRNP se encuentra extremadamente unido a una proteína Ago. Concentraciones de sal tan altas como KCl 2.5 M no afectan la disociación de los ARN pequeños con la proteína Ago durante la purificación por afinidad del RISC.<sup>48</sup> Las proteínas Ago tienen un peso molecular de alrededor de 100 kDa y poseen dos dominios conservados: PAZ y PIWI (*Figura 3*).<sup>53</sup> En el humano se han determinado cuatro miembros de las Argonauta (Ago1-Ago4), las cuales se han visto asociadas con ARNip/miARN (*Cuadros I y II*). Sin embargo, únicamente los complejos proteicos como RISC contienen a la Ago2 en su estructura.<sup>54,55</sup> Finalmente, los patrones y niveles de expresión diferentes de las proteínas Ago pueden controlar el grado al cual los distintos procesos de silenciamiento operan.<sup>25</sup>

Además de las proteínas centrales Ago y los ARN cortos, han sido identificados algunos otros compo-

nentes proteicos de los diferentes complejos de silenciamiento. Se han observado interacciones bioquímicas de Ago2/eIFc2c con FMRP (proteína del retraso mental frágil X).<sup>56</sup> Así mismo, en los miARN humanos, los cuales residen en un complejo definido 15S, se ha observado la presencia de Ago4 y las ARN helicasas Gemin3 y Gemin4.<sup>44</sup> No obstante, su función precisa de esta variedad de proteínas en el silenciamiento genético requiere de más estudios.

### Degradación del ARNm y represión traduccional

Los ARNipcs en RISC guían la degradación específica de secuencia de los ARNm objetivo complementarios o casi complementarios.<sup>46,48</sup> RISC corta al ARNm a la mitad de la región complementaria, 10 nt río arriba del nucleótido emparejado con el extremo 5' del ARNip guía.<sup>41</sup> La reacción de escisión guiada mediante RISC/miRNP es un proceso que no requiere ATP.<sup>47,50</sup> Sin embargo, se ha observado que el silenciamiento genético resulta ser más eficiente en su presencia.<sup>47</sup>

Los complejos RISC/miRNP catalizan la hidrólisis del enlace fosfodiéster del ARNm dejando terminaciones fosfato 5' e hidroxilo 3'.<sup>48,57</sup> Esta reacción también requiere iones Mg<sup>2+</sup>, al igual que la reacción hidrolítica que ocurre cuando Dicer genera los ARNip

**Cuadro I.** Factores involucrados en el silenciamiento genético mediado por ARNip.

Proteína	Dominios y motivos	Función	Referencias
Dicer	ARNasa III, DEAD, PAZ, MUAdc	Procesamiento de ARNdc	40
Ago 1	PAZ, PIWI	Unión a ARN dc	55
Ago 2	PAZ, PIWI	Unión a RISC	60
Ago 3	PAZ, PIWI	Unión a ARNdc	45
Tudor SN (P 100)	Tudor, nucleasa	?	48

**Cuadro II.** Factores involucrados en represión traduccional mediada por miARN.

Proteína	Dominios y motivos	Función	Referencias
Dicer	ARNasa III, DEAD, PAZ, MUAdc	Procesamiento de los pre-miARN	36
Drosha	ARNasa III	Procesamiento de los pri-miARN	29-32
DGCR8	WW	Procesamiento de los pri-miARN junto con Drosha	31
Ago 1	PAZ, PIWI	Unión a ARN dc	108
Ago 2	PAZ, PIWI	Unión a ARNdc	56
Ago 3	PAZ, PIWI	Unión a ARNdc	54
Ago 4	PAZ, PIWI	Unión de ARNdc	54
Gemin3	DEAD	ARN Helicasa	44
Germin4	?	?	44
Exportina-5	?	Exportación nuclear al citoplasma de los pre-miARN	33-35
FMRP	KH	Unión a ARN	56

de los ARNdc precursores.<sup>58,59</sup> Sin embargo, dentro de los candidatos para este importante proceso puede descartarse a Dicer.<sup>46,48</sup> La Tudor-SN caracterizada también como componente de RISC,<sup>60</sup> puede ser rechazada como la endonucleasa en cuestión, ya que como miembro de la familia proteica de las nucleasas micrococales, debe generar terminaciones fosfato 3' en vez de fosfato 5'. Recientemente se ha propuesto con base en la similitud del dominio PIWI con la ARNasa H, que las proteínas Ago pueden actuar por sí mismas como nucleasas;<sup>61</sup> lo cual falta de confirmarse, pues únicamente Ago2 es el miembro de la familia que presenta esta propiedad.<sup>25</sup>

En el caso de los miran, su sitio de unión al ARNm sobresale por ser de una complementariedad insufi-

ciente para llevarse a cabo el corte hidrolítico; aunque se ha visto que puede realizarse bajo ciertas condiciones especiales.<sup>48</sup> El mecanismo general de acción es la represión traduccional (*Figura 2*). La primera evidencia fue observada en *C. elegans* donde se demostró que los miARN específicos para un gen reducían la síntesis de proteínas sin afectar los niveles del ARNm<sup>26</sup> los cuales poseían en su región no traducible (UTR) 3' varios sitios de unión para el miARN, y tanto el ARNm como el miARN bloquean la elongación o terminación de la traducción, no así su iniciación.<sup>62-63</sup>

### EL ARNI Y SU POTENCIAL EN LAS ENFERMEDADES HUMANAS

Conocer y entender mejor el mecanismo del ARNi puede sin lugar a dudas, iluminar el oscuro camino que el ser humano transita a través de las enfermedades mortales; afortunadamente, los resultados por demás alentadores observados hasta nuestros días, colocan una luz más a favor de la humanidad.

#### ARNi como tratamiento contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El desarrollo y uso de dos o tres medicamentos combinados en el tratamiento de la infección causada por el VIH ha repercutido dramáticamente en el mejoramiento de la calidad de vida de los individuos contagiados. Pero, a pesar del éxito aparente de los nuevos medicamentos anti-retrovirales, existen los problemas emergentes de las variantes virales drogorresistentes así como la toxicidad en la combinación de los medicamentos administrados actualmente. Además existe el enorme interés por explorar nuevas propuestas terapéuticas antivirales. El VIH fue el primer agente infeccioso objeto del ARNi, quizá porque su ciclo de vida y patrón de expresión genética es bastante conocido. Se han utilizado ARNip y ARNhp – considerados estos últimos como la forma sintética de los miARN – como objetivo de varios ARN codificados por el VIH en líneas celulares hematopoyéticas primarias, que incluyen el elemento TAR,<sup>65</sup> tat,<sup>66-68</sup> rev,<sup>66,67</sup> gag,<sup>69,70</sup> env,<sup>70</sup> vif,<sup>65</sup> nef<sup>65</sup> y la transcriptasa reversa.<sup>68</sup>

A pesar del éxito en la inhibición mediada por ARNi de los diferentes ARN virales en cultivos de células, atacar el virus de manera directa representa un reto substancial para las aplicaciones clínicas, ya que debido a su alto índice de mutación se generan variantes que pueden evitar ser tratados eficientemente.<sup>71</sup> Quizá la regulación de los cofactores celulares requeridos para la infección del VIH sea una alternativa atractiva

o una propuesta complementaria. Algunos de estos, tales como el NF- $\kappa$ B,<sup>68</sup> el receptor CD4<sup>+</sup><sup>69</sup> y los co-receptores CXCR4 y CCR5<sup>72</sup> han sido exitosamente regulados mediante ARNi resultando en la inhibición de la replicación del VIH en numerosas líneas celulares y células primarias incluyendo linfocitos T y macrófagos derivados de células madre hematopoyéticas.<sup>65-67,69,72-75</sup> Aunque silenciar el NF- $\kappa$ B no es muy apropiado como terapia debido al importante papel que tiene en la célula (ej. respuesta del interferón), el co-receptor CCR5 se mantiene como una promesa particular. Este co-receptor no es esencial en la respuesta inmune normal, y los individuos homocigotos con una delección de 32 pares de bases (pb) en este gen, son resistentes a la infección del VIH, mientras que los individuos que son heterocigotos para esta delección muestran una progresión retardada al SIDA.<sup>76,77</sup> El uso de vectores lentivirales para traducir un ARNhp anti-CCR5 en linfocitos humanos, resulta en una modesta pero significativa reducción de tres a siete veces menos infección con respecto a los controles.<sup>78</sup> Desafortunadamente estas células tratadas con ARNhp aún eran susceptibles a la infección debido a que el virus T trófico utiliza el CXCR4; además, dado que el CXCR4 es esencial para la función normal de las células madre hematopoyéticas,<sup>79</sup> silenciar este co-receptor no es buena opción como terapia anti-VIH; mucho menos el receptor CD4.

No existe duda alguna de que los componentes virales deben ser incluidos en cualquier estrategia exitosa que utilice ARNi; así, mismo estos objetivos deben tener secuencias que se encuentren altamente conservadas para asegurar su eficacia contra todas las cepas virales.<sup>17</sup> La forma de administración de los ARNip/ARNhp en las células infectadas por el VIH es indiscutiblemente el otro gran reto. Las células objeto son linfocitos T primarios, monolitos y macrófagos. También debido a que los ARNip no persisten durante largos periodos de tiempo en las células, se tendría que administrar consecutivamente durante años para tratar eficazmente la infección. Hasta ahora los vectores lentivirales han sido utilizados como una de las estrategias anti-VIH más prometedoras.<sup>80-83</sup> Probablemente en un lapso menor de tres años la tecnología del ARNi pueda comenzar a aplicarse en ensayos clínicos humanos para el tratamiento del SIDA.

### ARNi en el tratamiento contra la hepatitis viral

La hepatitis viral es una de las enfermedades más importantes que afectan al ser humano, ya que miles de millones de individuos están infectados en todo el mundo. Su agente etiológico puede ser el virus de la

hepatitis B (VHB) y el de la hepatitis C (VHC). Actualmente contra el VHB existe una efectiva vacuna, pero ésta es sólo para prevención de la infección viral; sin embargo, en el caso del VHC no existe ninguna vacuna. Estos dos patógenos han sido prospectos muy importantes para evaluar la potencial terapia del ARNi. La primera demostración de la eficacia del ARNi contra un virus *in vivo* se realizó en ratones con VHB.<sup>84</sup> En este estudio se observó una significativa reducción del 99% en la replicación viral, logrado mediante la administración de ARNhp anti-VHB en los hepatocitos proveyendo una prueba importante del principio de las futuras aplicaciones antivirales del ARNi en el hígado.

También se han realizado trabajos aplicando el ARNi como terapia contra el VHC, el cual se estima está infectando cerca del 3% de la población mundial.<sup>17</sup> El VHC es la principal causa de enfermedades crónicas del hígado y puede dar origen a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Su genoma es una molécula de ARN con un sólo marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína, la cual es procesada post-traduccionalmente para producir por lo menos diez proteínas. La única terapia actual disponible es una combinación del interferón con ribovirina, pero la respuesta a esta terapia es frecuentemente pobre, particularmente con ciertos tipos de virus.<sup>17</sup>

Varios grupos de investigadores han probado la eficacia de los ARNip en la inhibición del replicón del VHC.<sup>85-87</sup> Los ARNip dirigidos contra el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o contra los ARNm que codifican las proteínas víricas no estructurales NS3 y NS5B inhibieron la función del replicón en células cultivadas;<sup>86</sup> además redujeron el número de células Huh-7 con replicones VHC persistentes.<sup>85</sup>

En otro estudio *in vivo* se utilizaron ARNip para el tratamiento de una hepatitis fulminante inducida mediante un anticuerpo agonístico específico de Fas en ratones. Los ARNip anti-Fas fueron inyectados en los ratones tratados con anticuerpos: 82% sobrevivieron durante diez días de observación, mientras que todos los controles murieron a los 3 días.<sup>88</sup> Cabe resaltar que los ratones que ya habían padecido de hepatitis auto-inmune también mostraron mejoría con el mismo tratamiento. Desgraciadamente trabajos en células humanas no han sido concluyentes, no obstante, estos resultados dejan ver que el uso de los ARNip para atacar las vías de la respuesta inflamatoria en vez del agente infeccioso, puede ser más accesible para tratar la enfermedad.

Al igual que el tratamiento anti-VIH, la forma de liberación o administración de los ARNip/ARNhp es

el reto principal para el tratamiento exitoso del VHC. El método utilizado en varios estudios *in vivo* en ratones como es la inyección intravenosa hidrodinámica, no es viable para el tratamiento de la hepatitis humana. En el caso de conejos, el material genético puede ser introducido directamente a los hepatocitos a través de catéteres o inclusive por procedimientos hidrodinámicos,<sup>89</sup> pero falta determinar si éstos pueden ser aplicados en ensayos clínicos en humanos.

### ARNi en el tratamiento contra el cáncer

Varios estudios han utilizado a los ARNip como herramienta para desentrañar las vías celulares que originan la proliferación celular descontrolada y el cáncer, así mismo la maquinaria del ARNi ha sido propuesta como un candidato potencial para su tratamiento.<sup>90-92</sup> No se tienen antecedentes sobre ensayos clínicos o el uso del ARNi, únicamente se conoce del uso de agentes antisentido.<sup>93</sup>

El inconveniente principal, la liberación de los ARNip, debe ser superado a través de mecanismos altamente eficientes para su éxito en el tratamiento del cáncer. Se han desarrollado modificaciones al esqueleto de los ARNip sintéticos que les proporciona mayor resistencia a las nucleasas séricas, así como una mayor vida media en los modelos animales.<sup>94,95</sup> Sin embargo, la estabilidad incrementada de los ARNip no es suficiente a menos que puedan penetrar en las células y tejidos *in vivo* a concentraciones suficientes para ser terapéuticamente funcionales. Debido a que son moléculas de doble cadena, la liberación e ingesta celular es más complicada que para los agentes antisentido de una sola cadena, los cuales se unen a las proteínas séricas y son engullidas por la células y tejidos *in vivo*.<sup>96</sup> Existen pocos reportes de ARNi funcional que haya sido obtenido de la liberación sistemática de ARNip encapsulados en liposomas, pero el uso de lípidos catiónicos o iónicos para la liberación *in vivo* de agentes antisentido nunca se han llevado a la fase de ensayo clínico. Por lo tanto, es necesario comprender y desarrollar mejores modificaciones a los ARNip así como alternativas suficientes en la liberación sistemática de los mismos en la célula cancerosa.

El uso de ARNi para silenciar genes que expresan proteínas oncogénicas de fusión, como son las Bcr-Abl oncoproteína p210, características la leucemia mieloide crónica (LMC), ha dado una excelente prueba del principio de la ARNi como excelente agente anticancerígeno. En el caso de la LMC, las principales opciones de tratamiento han sido la quimioterapia,

transplante de médula ósea alogénica, transplante de células totipotenciales de cordón umbilical y más recientemente, el uso de una molécula pequeña, el inhibidor de tirosina cinasa (imatinib). A pesar del entusiasmo inicial acerca del potencial de esta molécula, un número creciente de pacientes han desarrollado cierta resistencia a él,<sup>97-100</sup> haciendo necesaria la búsqueda de fármacos alternativos de tratamiento. Las Bcr-Abl 210 han sido selectivamente reguladas tanto por ARNip sintéticos como por ARNhp transducidos en vectores lentivirales en líneas celulares.<sup>101-103</sup> Es importante destacar que la regulación es únicamente selectiva para la oncoproteína p210 y su ARNm, la cual resulta en la inhibición de la proliferación celular como una consecuencia directa de la acción del ARNi. Debido a que las enfermedades hematológicas son frecuentemente tratadas por medio del transplante de médula ósea, es posible desarrollar una técnica que incluya la participación del ARNi. Nuevamente la administración es el punto clave.

### ARNi en el tratamiento contra la hipercolesterolemia

La hipercolesterolemia es una de las causas principales en infartos al miocardio, condición que no sólo afecta personas mayores, sino también a adultos jóvenes, los cuales forman la mayor parte de la población económicamente activa. Si bien no existen ensayos clínicos aún en seres humanos, los trabajos realizados en ratones; han demostrado resultados importantes, además de superar las expectativas de la condicionante administración.<sup>104,105</sup> Se decidió silenciar al ARNm que codifica a la apolipoproteína B, una molécula involucrada en el metabolismo del colesterol. Las concentraciones de esta proteína en muestras de sangre humana, correlacionan con las del colesterol y los niveles elevados de ambos compuestos están asociados con un riesgo elevado de enfermedades coronarias.

Los ARNip que se sintetizaron para este propósito contenían modificaciones de estabilización selectivas que los hacía unirse a un grupo colesterol, ligado químicamente al grupo hidroxilo terminal de la cadena con sentido del ARN. Las inyecciones intravenosas de los conjugados de ARNip-colesterol en los ratones, se efectuaron en diversos tejidos incluyendo el hígado, yeyuno, corazón, riñones, pulmones y tejido graso. Muy importante fue la eficiencia de los ARNip al reducir los niveles del ARNm que codifica para la apolipoproteína B en más del 50% en hígado y 70% en yeyuno.<sup>106</sup>

Lo extraordinario de estos resultados, tal vez sea, debido a la sencillez, el método de administración; pues el sistema no requiere lípidos complejos caros u otras macromoléculas. El uso del colesterol mismo ayuda a la célula a ingerir a los ARNi y liberarlos en su interior. Nuevamente se deja entrever que el uso del ARNi en moléculas que interfieran con la vía molecular del objetivo (en este caso la apolipoproteína B y el colesterol) también es capaz de producir los efectos deseados.

Finalmente, en un lapso muy corto y productivo desde su descubrimiento en organismos modelo, el mecanismo del ARNi ha surgido como una herramienta poderosa en el estudio de la función genética en mamíferos. Como un evento importante surge su uso en organismos completos desde un enfoque terapéutico, donde los primeros frutos comienzan a cosecharse. Quizá el principal reto a vencer a corto plazo es el problema de su administración *in vivo* en ensayos clínicos en seres humanos; después, la comercialización del primer medicamento basado en el ARNi. Más importante será conocer si el fenómeno del ARNi podrá revolucionar el tratamiento de las enfermedades humanas de la misma forma que ha revolucionado la investigación básica de la función genética en el vasto mundo de la Biología.

#### REFERENCIAS

- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431: 356-363.
- Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature* 2004; 430: 161-164.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 457-467.
- Jorgensen R. Altered gene expression in plants due to *trans* interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* 1990; 8: 340-344.
- Napoli CA, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthetase gene in *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 1990; 2: 291-299.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje A. Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990; 2: 291-299.
- Lau NC, Bartel DP. Censors of the genome. *Sci Am* 2003; 8: 34-41.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 110-119.
- Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 1992; 6: 3343-3356.
- Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 489-512.
- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 2004; 6: 509-519.
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251.
- 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: 806-811.
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991; 113: 503-514.
- Guo S, Kemphues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; 81: 611-620.
- Grishok A, Tabara H, Mello CC. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 2000; 287: 2494-2497.
- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-378.
- Bonetta L. RNAi: Silencing never sounded better. *Nat Methods* 2004; 1: 79-85.
- Williams RB. Role of the double-stranded RNA activated-protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 509-513.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264.
- Elbashir SM, Hartborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498.
- Kim DH, Belkhe MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 222-226.
- Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 227-231.
- Waterhouse PM, Wong MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001; 411: 834-842.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-349.
- Bartel DP. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060.
- Lee Y, Jean K, Lee J, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-4670.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sader C, Gröisser FA, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2: 269-276.
- Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: Drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 2005; 15: R61-R64.
- Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6593-6597.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-191.

34. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98.
35. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen RB. Exportin-5 mediates the nuclear exports of pre-microRNAs and short hairpins RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-3016.
36. Hutvagner G, McLachlan J, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A celular function for the RNA interference enzyme Dicer in small temporal RNA maturation. *Science* 2001; 93: 834-838.
37. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106: 23-34.
38. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; 117: 69-81.
39. Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman Z, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; 2: E104.
40. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
41. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200.
42. Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 2002; 10: 549-561.
43. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-296.
44. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charrour B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002; 16: 720-728.
45. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 193: 1146-1150.
46. Martínez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-574.
47. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-2060.
48. Martínez J, Tuschl T. RISC a 5'phospho monoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 2004; 18: 975-980.
49. Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ. A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 2004; 117: 83-94.
50. Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNAi pathway. *Cell* 2001; 107: 309-321.
51. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNA and miRNA exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-216.
52. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Assymetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.
53. Cornell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem-cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 2733-2742.
54. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Thomas Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-197.
55. Liu J, Carmell LA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-1441.
56. Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nature Neurosci* 2004; 7: 113-117.
57. Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD. The RNA induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup> - dependent endonuclease. *Curr Biol* 2004; 14: 787-791.
58. Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Rådmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 2002; 21: 5864-5874.
59. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002; 21: 5875-5885.
60. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathorn AM, Tops BBJ, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 2003; 425: 411-414.
61. Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 2004; 429: 318-322.
62. Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after initiation of translation. *Dev Biol* 1999; 216: 671-680.
63. Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002; 243: 215-225.
64. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that co-purify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 360-365.
65. Jaque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-438.
66. Lee NS, Dohjima D, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 500-505.
67. Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002; 76: 9225-9231.
68. Surabhi RM, Gaynor RB. RNA interference directed against human immunodeficiency virus type-1 replication. *J Virol* 2002; 76: 12963-12973.
69. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nature Med* 2002; 8: 681-686.
70. Park WS, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, Nakajima E, Matsuzaki T, Shimada F, et al. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4830-4835.
71. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Human immunodeficiency virus type-1 escape from RNA interference. *J Virol* 2003; 77: 11531-11535.
72. Martínez MA, Gutierrez A, Armand-Ugón A, Blanco J, Parera M, Gómez J, et al. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 2002; 16: 2385-2390.
73. Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 2002; 169: 5196-5201.

74. Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Lee NS, Rossi J, et al. Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-humice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 2003; 8: 62-71.
75. Li MJ, Bauer G, Michienzi A, Yee JK, Lee NS, Kim J, et al. Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Mol Ther* 2003; 8: 196-206.
76. Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, et al. Heterozygosity for a deletion in the *CCR-5* gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T cell-decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 1997; 11: 305-310.
77. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR-5* chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382: 722-725.
78. Qin XF, An DS, Chen IS, Batimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against-CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 183-188.
79. Dell'Agnolo C, Rabascio C, Mancuso P, Capillo M, Pruneri G, Gobbi A, et al. *In vitro* and *in vivo* hematopoietic potential of human stem cells residing in muscle tissue. *Exp Hematol* 2002; 30: 905-914.
80. Dropulic B. Lentivirus in the clinic. *Mol Ther* 2001; 4: 511-512.
81. Davis BM, Humeau L, Dropulic B. *In vivo* selection for human and murine hematopoietic cells transduced with a therapeutic MGMT lentiviral vector that inhibits HIV replication. *Mol Ther* 2004; 9: 160-172.
82. Amado RG, Mitsuyasu RT, Rosenblatt JC, Ngok FK, Bakker A, Cole S, et al. Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-derived ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum Gen Ther* 2004; 15: 251-262.
83. Michienzi A, Castanotto D, Lee N, Li S, Zaia JA, Rossi JJ. RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1002: 63-71.
84. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis virus B by RNA interference. *Nature Biotechnol* 2003; 6: 639-644.
85. Randall G, Grakovi A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell cultured by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 235-240.
86. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human livers cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2738-1788.
87. Kapodia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2014-2018.
88. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Med* 2003; 9: 347-351.
89. Eastman SJ, Baskin KM, Hodges BL, Chu Q, Gates A, Dreusicke R, et al. Developmental of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA. *Hum Gen Ther* 2002; 13: 2065-2077.
90. Kittler R, Buchholz F. RNA interference: gene silencing in the first lane. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 259-265.
91. Wall NR, Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited from therapy? *Lancet* 2003; 362: 1401-1403.
92. Lu PY, Xie FY, Woodle MC. siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 225-234.
93. Buchele T. Proapoptotic therapy with oblimersen (bcl-2 antisense oligonucleotide)-review of preclinical and clinical results. *Onkologie* 2003; 26: 60-69.
94. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 2003; 9: 1034-1048.
95. Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 13: 169-189.
96. Wang L, Prakash RK, Stein CA, Koehn RK, Ruffner DE. Progress in the delivery of therapeutic oligonucleotides organ/cellular distribution and targeted delivery of oligonucleotides *in vivo*. *Antisense Acid Drug Dev* 2003; 31: 2705-2716.
97. Holtz MS, Bhatia R. Effect of imanitib mesylate on chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 237-245.
98. Tauchi T, Ohyashiki K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imanitib mesylate. *Leuk Res* 2004; 28: 39-45.
99. Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, Griffin JD, Fabbro D, Furet P, et al. Imanitib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia and potential strategies for treatment. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 285-299.
100. Marcucci G, Perrotti D, Caligiuri MA. Understanding the molecular basis of imanitib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia and the related mechanisms of resistance. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1248-1252.
101. Li MJ, McMahon R, Synder DS, Yee JK, Rossi JJ. Specific killing of Ph+ chronic myeloid leukemia cells by a lentiviral vector-delivered anti-bcr/abl small hairpin RNA. *Oligonucleotides* 2003; 13: 401-409.
102. Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vomlocher HP, Knabbe C, Duyster J, et al. Inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNS sensitizes for imanitib mesylate (STI571). *Blood* 2003; 102: 2236-2239.
103. Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heindenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA. *Blood* 2003; 101: 1566-1569.
104. Check E. Hopes rise RNA therapy as mouse study hits target. *Nature* 2004; 432: 136.
105. Rossi JJ. A cholesterol connection in RNAi. *Nature* 2004; 432: 155-156.
106. Soutscheck J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constain R, Donoghue M, et al. Therapeutics silencing of an endogenous gene by administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178.
107. Clayton J. The silent treatment. *Nature* 2004; 431: 598-609.
108. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 2004; 18: 1655-1666.