

RNA de interferencia: biogénesis, mecanismos moleculares y sus aplicaciones en cáncer cervical

Oscar Peralta-Zaragoza,* Víctor Hugo Bermúdez-Morales,* Vicente Madrid-Marina*

* Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer, Instituto Nacional de Salud Pública.

RNA interference: Biogenesis molecular mechanisms and its applications in cervical cancer

ABSTRACT

RNAi (RNA interference) is a natural process by which eukaryotic cells silence gene expression through small interference RNAs (siRNA) which are complementary to messenger RNA (mRNA). In this process, the siRNA that are 21-25 nucleotides long and are known as microRNA (miRNA), either associate with the RNA-induced silencing complex (RISC), which targets and cleaves the complementary mRNAs by the endonucleolytic pathway, or repress the translation. It is also possible to silence exogenous gene expression during viral infections by using DNA templates to transcribe siRNA with properties that are identical to those of bioactive microRNA. Persistent human papillomavirus (HPV) infection is the main etiological agent during cervical cancer development and the HPV E6 and E7 oncogenes, which induce cellular transformation and immortalization, represent strategic targets to be silenced with siRNA. In several in vitro and in vivo studies, it has been demonstrated that the introduction of siRNA directed against the E6 and E7 oncogenes in human tumoral cervical cells transformed by HPV, leads to the efficient silencing of HPV E6 and E7 oncogene expression, which induces the accumulation of the products of the p53 and pRb tumor suppressor genes and activates the mechanism of programmed cell death by apoptosis; thus, the progression of the tumoral growth process may be prevented. The goal of this review is to analyze the microRNA biogenesis process in the silencing of gene expression and to discuss the different protocols for the use of siRNA as a potential gene therapy strategy for the treatment of cervical cancer.

Key words. Cervical cancer. E6 and E7 oncogenes. HPV. MicroRNA. RNAi, siRNA.

RESUMEN

El mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) es un proceso natural por el cual las células de eucariontes silencian la expresión de genes, a través de la generación de RNA pequeños de interferencia (siRNA) de secuencia complementaria con el RNA mensajero (mRNA). En este proceso, los siRNA de 21-25 nucleótidos de longitud, conocidos como MicroRNA, se asocian con el complejo de silenciamiento inducido por RNAi (RISC), el cual señaliza y degrada los mRNA complementarios por rompimiento endonucleolítico, o bien, reprimen la traducción del transcrito. Adicionalmente, es posible usar secuencias de DNA para transcribir siRNA con características idénticas a los MicroRNA bioactivos, para silenciar la expresión de genes exógenos durante las infecciones virales. La infección persistente por el virus de papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico asociado al desarrollo del cáncer cervical y los oncogenes E6 y E7 de HPV, que están involucrados en la transformación e immortalización celular, representan blancos estratégicos para silenciar su expresión por siRNA. En varios estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que al introducir siRNA dirigidos contra los oncogenes E6 y E7 en células cervicales tumorales humanas transformadas por HPV, se genera el silenciamiento eficiente de los oncogenes E6 y E7, lo cual induce la acumulación de los productos de los genes supresores de tumores p53 y pRb, se activa la muerte celular por apoptosis, y se puede evitar la progresión del proceso tumoral. Por lo tanto, el propósito de la presente revisión es analizar el proceso de biogénesis de los MicroRNA en el mecanismo del silenciamiento de la expresión de genes, y discutir los protocolos con el uso de siRNA como una potencial estrategia de terapia génica para el tratamiento del cáncer cervical.

Palabras clave. Cáncer cervical. HPV. MicroRNA. Oncogenes E6 y E7. RNAi, siRNA.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo de RNAi fue observado inicialmente en plantas en donde fue llamado co-supresión y después reconocido como una forma de silenciamiento de genes dependiente de la complementariedad de secuencias nucleotídicas con los transcritos de mRNA.¹ Posteriormente, este proceso fue identificado por Fire, *et al.*, quienes demostraron la naturaleza bioquímica de los dsRNA para inducir el silenciamiento de genes al introducirlos directamente en *Caenorhabditis elegans*.² Actualmente se sabe que la mayoría de los organismos eucariontes tienen un gran número de genes que se transcriben en forma de RNA pequeños conocidos como MicroRNA, los cuales son las moléculas efectoras naturales del mecanismo de RNAi en las células eucariontes.³ Los MicroRNA inducen sus efectos a nivel del mRNA por inhibición de la traducción, o a través de la degradación de mRNA blanco. El nivel de complementariedad de las bases nucleotídicas entre los MicroRNA y los mRNA específicos define cuál proceso se realizará. La perfecta complementariedad de bases entre los MicroRNA y el mRNA induce la degradación de los transcritos, mientras que varias bases no apareadas producen arresto de la traducción.³ El conocimiento que se ha generado del mecanismo de RNAi ha tenido progresos considerables, por lo que ahora se sabe que los MicroRNA son una nueva familia de RNA pequeños endógenos, que son diversos en secuencia, que tienen patrones de expresión tejido-tiempo-específicos independientes, que se encuentran evolutivamente conservados y que están implicados en los mecanismos reguladores postranscripcionales del silenciamiento de la expresión de genes secuencia-específicos.⁴⁻⁶ Adicionalmente, se ha descrito que el proceso de RNAi está implicado en la movilización de elementos genéticos transponibles (transposones), así como en el mecanismo de defensa normal de las células contra las infecciones virales.⁷ Por lo tanto, para la especie humana la relevancia del silenciamiento de la expresión de genes por RNAi se apreciará mejor cuando se conozcan los componentes moleculares y los mecanismos de regulación de éste proceso, en condiciones fisiológicas normales, así como durante el desarrollo de patologías que tienen alteraciones de la expresión génica, como es el caso del proceso de carcinogénesis.

De particular interés es el cáncer cérvico uterino (CaCU), el cual representa la segunda causa más común de muerte por cáncer en la población femenina en el mundo.⁸ Las evidencias clínicas, epidemiológicas y moleculares asocian a la infección persistente

del virus de papiloma humano (HPV) como el agente etiológico involucrado en el desarrollo del cáncer cervical; y la presencia de los genomas del HPV de alto riesgo están asociados con el 99.7% de todos los carcinomas cervicales estudiados.^{8,9} Los productos de los oncogenes E6 y E7 de HPV tienen propiedades de transformación celular por interacción directa o indirecta con proteínas celulares que están implicadas en la regulación del ciclo celular. La oncoproteína E6 interactúa con la proteína celular p53, la cual se degrada por la vía del proteosoma; y la oncoproteína E7 se asocia con la proteína celular pRb para inducir la liberación del factor de transcripción E2F activo. Estas interacciones producen una desregulación de la proliferación y diferenciación celular e inhiben la apoptosis, lo cual contribuye substancialmente a la transformación e inmortalización celular durante el proceso de carcinogénesis cervical.^{8,9}

Muchos son los esfuerzos que se han realizado para el diseño de nuevas drogas, así como de terapia génica para el tratamiento del cáncer cervical.¹⁰ Por más de una década se han enfocado los esfuerzos para el tratamiento del CaCU por el estudio de la inhibición de los mRNA de los oncogenes virales E6 y E7 de HPV para el diseño de estrategias terapéutica tales como el uso de oligonucleótidos anti-sentido. Se ha demostrado que los oligos anti-sentido dirigidos hacia los oncogenes E6 y E7 reprimen la expresión de estos oncogenes, inducen la expresión de p53, generan la liberación de citocromo C al citoplasma, inducen la activación de pro-caspasas 3 y 9, inhiben la actividad de telomerasa e inducen la muerte celular por apoptosis.¹¹⁻¹³ Estos hallazgos sugieren que los oligos anti-sentido inducen un arresto inmediato de la división celular e inducen la apoptosis en las células cancerosas. Sin embargo, estos diseños presentan varios inconvenientes ya que los oligos anti-sentido tienen efectos de baja eficiencia, tienen periodos cortos de estabilidad y tienen altos costos para el diseño y administración. Alternativamente se ha demostrado que el mecanismo de RNAi reprime en varias órdenes de magnitud y de manera más eficiente la expresión de los oncogenes virales a nivel post-transcripcional comparativamente que el tratamiento con oligos anti-sentido.^{14,15} Por lo tanto, el conocimiento de los eventos moleculares en el proceso de la biogénesis de los MicroRNA, en el silenciamiento de la expresión de genes por RNAi, y de sus aplicaciones durante el desarrollo del cáncer cervical; representa una estrategia real y eficiente de terapia génica contra el desarrollo de esta neoplasia.

BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNA

En los organismos eucariontes la RNA Pol II transcribe los mRNA codificantes, pero además transcribe las secuencias de DNA que contienen los RNA pequeños no codificantes a partir de unidades independientes de transcripción.⁷ Además, en la especie humana, aproximadamente una cuarta parte de todos los RNA pequeños están localizados en intrones y son transcritos por la RNA Pol II.⁷ Se ha demostrado que estos transcritos son relativamente largos de varios kilobases de longitud, contienen residuos de uridina, contienen la señal 5'-cap, son diferencialmente transcritos durante el desarrollo del organismo; y se han usado para producir genes de fusión con genes reporteros.¹⁶⁻¹⁸ El resto de los RNA pequeños son transcritos por la RNA Pol III, los cuales están agrupados en el genoma humano en transcritos multicistronicos. Estos RNAs tienen la misma orientación en el genoma, pero es probable que no sean transcritos por los mismos promotores.⁴ Los transcritos de RNA pequeños son procesados para generar las dos principales especies de RNA funcionales de 21 a 25 nucleótidos de longitud, que corresponden a los Micro RNA maduros (MicroRNA) y a los RNA pequeños de interferencia (siRNA); los cuales sirven como RNA guías para dirigir la maquinaria reguladora post-transcripcional a los mRNA blanco específicos. Los MicroRNA controlan la dinámica del desarrollo en una amplia variedad de organismos eucariontes, complementan secuencia-específico en la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA, inducen la represión de la traducción, y como resultado inhiben la transición al siguiente estado del desarrollo embrionario del organismo. Los siRNA reclutan a complejos moleculares de ribonucleasas para la degradación de los mRNA blanco específicos.⁴⁻⁷

En relación con el proceso de biogénesis de los MicroRNA maduros, los eventos comienzan en el interior del núcleo. Los transcritos primarios de MicroRNA (pri-MicroRNA) son procesados para generar un RNA intermediario conocido como MicroRNA precursor (pre-MicroRNA). Los pre-MicroRNA tienen una longitud de 60 a 110 nucleótidos y forman estructuras secundarias tipo tallo-asa. El procesamiento de los pri-MicroRNA para generar el pre-MicroRNA es mediado por una endonucleasa RNasa tipo III llamada Drosha, la cual hidroliza las hebras del RNA en sitios cercanos a la base de la estructura secundaria tallo-asa.¹⁹⁻²⁵ Drosha está constituido por dos complejos multiproteicos. El complejo mayor contiene diferentes clases de proteínas asociadas al

RNA, que incluye RNA helicasas, proteínas que se unen al dsRNA, ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, y proteínas de la familia del sarcoma de Wing. El complejo menor conocido como microprocesador, está compuesto propiamente por la endonucleasa Drosha, por proteínas de unión al dsRNA, y por el producto del gen deletado del síndrome de Di George (DGCR8).^{20,21} Los estudios de *knock-down in vivo* y de reconstitución *in vitro* indican que los componentes del complejo menor de Drosha, son necesarios y suficientes para mediar la génesis de los MicroRNA a partir de los transcritos de pre-MicroRNA.²⁰⁻²² Los pre-MicroRNA son entonces exportados al citoplasma por el factor Ran intercambiador de nucleótido de guanina (Ran-GTP) y el receptor Exportina-5.²⁶⁻²⁹ A continuación, los pre-MicroRNA son procesados por una segunda RNasa tipo III citoplasmática llamada Dicer, para producir los dsRNA maduros de 21 a 25 nucleótidos. Estos dsRNA son separados en una sola hebra para generar los RNA pequeños de interferencia (siRNA) de una sola cadena.^{30,31} La clonación y caracterización del gen humano de Dicer ha permitido producir la correspondiente proteína recombinante y se han identificado sus propiedades de unión al RNA y su actividad de RNasa. A partir del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal de Dicer se ha identificado dos dominios de helicasa, un dominio de interacción con proteínas (PID), un dominio PAZ, varios dominios de RNasa en tándem, y un dominio de unión al dsRNA (dsRBD)³²⁻³⁴ (Figura 1).

En el siguiente evento de la biogénesis de los MicroRNA, un solo siRNA maduro es incorporado en un complejo ribonucleoproteico efector, conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNAi (RISC).^{35,36} El complejo RISC asociado con el MicroRNA guía maduro identifica a los mRNA blanco por complementariedad de bases nucleotídicas y produce la hidrólisis endonucleolítica de los mRNA, o bien genera la represión de la traducción. La tendencia de la vía molecular dependerá del nivel de complementariedad de las bases nucleotídicas. Una complementariedad total inducirá degradación del mRNA, mientras que una complementariedad parcial con algunas bases desapareadas, producirá represión de la traducción.^{37,38} Diversos estudios han identificado a las proteínas Argonauta 2 (Ago2) y Dicer en la composición del complejo RISC, así como en el mecanismo de ensamblaje.³⁹⁻⁴⁴ La proteína Ago2 tiene actividad catalítica de endonucleasa y por análisis estructural se ha podido identificar el dominio PIWI como el centro catalítico con actividad semejante a RNasa H.⁴⁵⁻⁴⁸ Se ha caracterizado el

cDNA de Ago2 y se ha generado la proteína recombinante correspondiente con la que se ha analizado la actividad de endonucleasa de los mRNA blanco con el uso de siRNA.⁴⁹ Sin embargo, se ha demostrado que el complejo mínimo Ago2-siRNA no es totalmente funcional. En contraste, se ha reportado una actividad elevada de RISC proveniente de lisados celulares,^{41,50} lo que sugieren que el complejo RISC funcional puede contener varios co-factores proteicos adicionales a Ago2, que pueden contribuir a su actividad biológica. Se ha reportado una asociación física de Ago2 con Dicer tanto *in vitro* como en purificaciones de diferentes organismos,⁵¹⁻⁵⁶ lo que sugiere que Dicer es un potencial componente del complejo RISC. (Figura 1).

La identificación de la proteína R2D2 en *Drosophila*,⁵⁷ de la proteína RDE4 en *C. elegans*,^{54,58,59} y de la proteína TRBP en humanos;⁵⁶ proporcionaron evidencias adicionales que demostraron la compo-

sición molecular del complejo RISC, así como el acoplamiento entre la fase de iniciación y la fase efectora del mecanismo de RNAi en las diferentes especies estudiadas. Se ha demostrado que Dicer puede procesar los dsRNAs largos en siRNA, mientras que el acoplamiento de siRNA con el complejo RISC requiere de R2D2, RDE4, Ago2 y TRBP.^{56,57,60,61} Además, se ha reportado la interacción física entre Dicer, TRBP y Ago2, y este complejo es funcional cuando se adiciona siRNA o pre-MicroRNA para inducir la hidrólisis de mRNA blanco. Por lo tanto, la separación de las cadenas de dsRNA puede ser realizada por la actividad helicasa de Dicer, mientras que la degradación de los mRNA es mediada tanto por las actividades endonucleolíticas del mismo Dicer, así como por Ago2.⁵⁶ Estos hallazgos demuestran la funcionalidad del complejo RISC durante la fase de iniciación para la generación de MicroRNA y sugieren que RISC puede participar en los eventos poste-

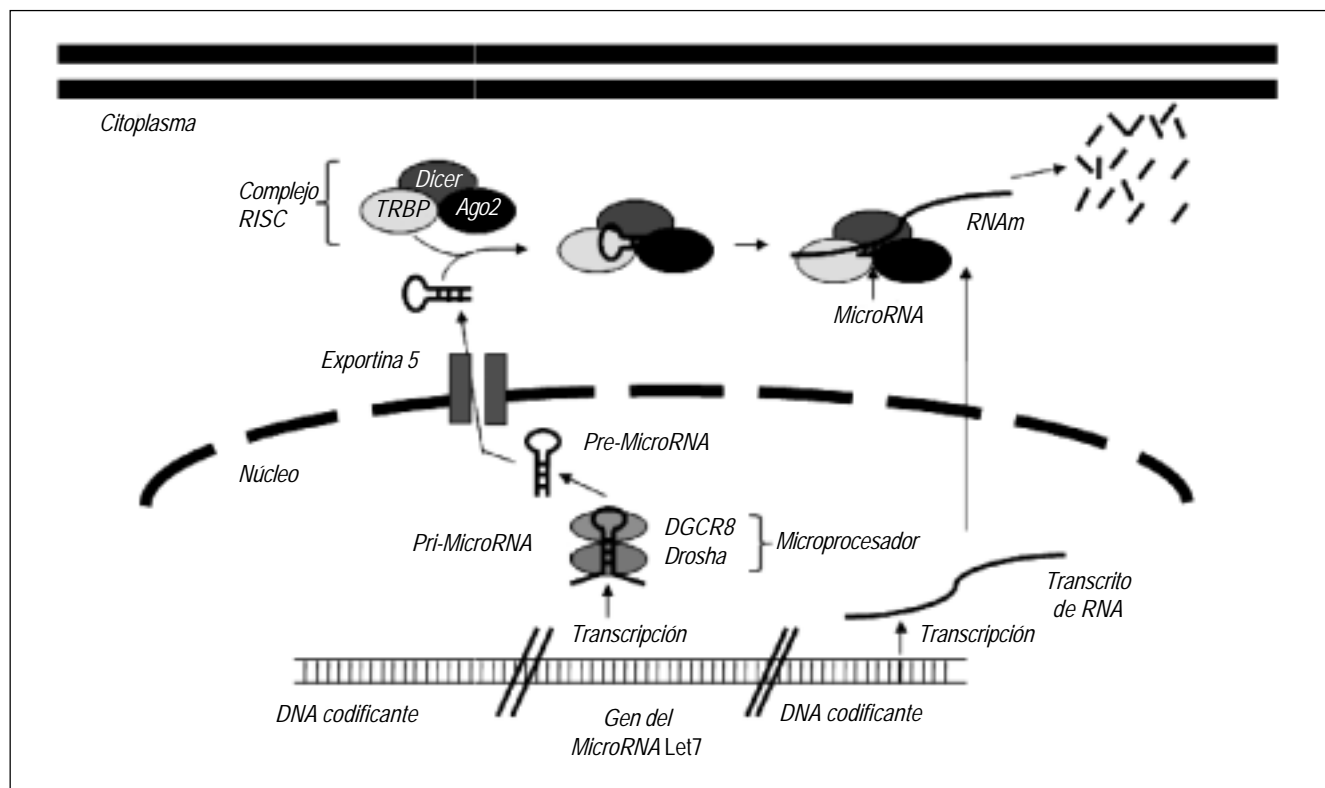


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de RNA de interferencia. La biogénesis de los MicroRNAs comienza en el núcleo de la célula en donde se transcribe el DNA que contiene los MicroRNAs por la RNA Pol II para generar los pri-MicroRNAs. Los pri-MicroRNAs tienen una longitud entre 60-110 nucleótidos y son procesados por el microprocesador, el cual está constituido por la proteína DGCR8 y la endonucleasa Drosha, para generar los pre-MicroRNAs. Los pre-MicroRNAs son exportados al citoplasma por el factor de intercambio de nucleótido de guanina Ran (Ran-GTP) y el receptor Exportina-5. A continuación los pre-MicroRNAs se acoplan al complejo RISC, el cual está compuesto por TRBP, Ago2 y Dicer. El complejo RISC a través de la endonucleasa Dicer procesa a los pre-MicroRNA para generar a los MicroRNAs maduros de una sola cadena de RNA y de una longitud de 21-25 nucleótidos. Los MicroRNAs se acoplan a los mRNA blanco por complementariedad de bases y se induce el silenciamiento de la expresión de genes a nivel post-transcripcional por la degradación de los transcritos específicos o por inhibición de la traducción.

riores del mecanismo de RNAi, esto es en la fase efectora de la regulación post-transcripcional del silenciamiento de genes.⁵⁶⁻⁶³ Finalmente, el procesamiento de pre-MicroRNA y el ensamblaje de RISC están funcionalmente acoplados para catalizar múltiples ciclos de hidrólisis de los mRNA blanco específicos⁴⁴ (Figura 1).

Adicionalmente a la identificación de los MicroRNAs, también se han identificado RNAs de interferencia pequeños endógenos denominados como endo-siRNA en la maquinaria molecular del mecanismo de RNAi. Inicialmente los endo-siRNA fueron reportados en plantas, pero posteriormente fueron caracterizados en eucariontes y en células de mamíferos. A partir de la secuenciación masiva de RNAs pequeños en células somáticas y en líneas germinales de *Drosophila*, se ha identificado una población de RNAs que se han denominado como endo-siRNA.⁶⁴⁻⁶⁹ Se ha demostrado que estos RNAs pequeños tienen una longitud exacta de 21 nucleótidos, tienen una orientación sentido y antisentido, tienen extremos 3' modificados, el extremo 5' no comienzan con un uracilo, y la generación de este tipo de endo-siRNA requiere de la actividad de Dicer.⁶⁴⁻⁶⁹ Se ha demostrado que estos endo-siRNA derivan de transposones, de secuencias de heterocromatina, de regiones intergénicas, de transcritos largos de RNA, y de manera interesante de mRNA codificantes. La expresión de transposones aumenta en moscas que tienen mutantes de *dicer2-* y *ago2-*, lo que sugiere una vía de RNAi endógena en el silenciamiento de transposones, como previamente ha sido reportado en *C. elegans*.^{70,71} Con respecto a los endo-siRNA derivados de mRNA, se ha identificado que son diez veces más frecuentes que las predicciones por análisis de bioinformática, lo que sugiere que los endo-siRNA se originaron a partir de transcritos complementarios endógenos de dsRNA.⁶⁴ También se ha documentado la generación de endo-siRNA derivados de loci estructurados, los cuales pueden plegarse en estructuras secundarias tipo tallo-asa.⁶⁵⁻⁶⁷ Se ha demostrado que la acumulación de estos endo-siRNA requieren de la actividad de Dicer y de la proteína loQS, la cual es un acoplador de Dicer que participa en la biogénesis de endo-siRNA para generar transcritos repetidos, invertidos y complementarios.^{72,73}

En mamíferos, los primeros endo-siRNA que se reportaron corresponden al elemento nuclear interespaciador del retrotransposon L1, los cuales fueron detectados en células humanas cultivadas.⁷⁴ El L1 contiene en el extremo 5'-UTR promotores en orientación sentido y antisentido que podrían dirigir la transcripción de manera bidireccional generando

transcritos complementarios sobrepuestos que son procesados como siRNA por la actividad de Dicer. Adicionalmente, se han identificado endo-siRNA en ovocitos de ratón. Estos endo-siRNA tienen una longitud de 21 nucleótidos, son dependientes de las actividades de Dicer y de Ago2, y son generados a partir de una amplia variedad de fuentes genómicas.^{75, 76} Un grupo de endo-siRNA se ha identificado en posiciones cercanas a genes que codifican para proteínas y son capaces de complementar con pseudogenes para formar estructuras repetidas invertidas. También se ha demostrado que algunas secuencias de pseudogenes tienen la habilidad para generar transcritos antisentido que pueden complementar con genes codificantes para producir endo-siRNA.⁷⁷ Estos hallazgos han contribuido al estudio de conocer como los endo-RNAs tienen complementariedad de bases con los mRNA codificantes, y de manera interesante identificar cuáles son los mecanismos de regulación de la expresión de genes celulares mediados por los endo-siRNA.

CRITERIOS PARA LA GENERACIÓN Y ADMINISTRACION DE siRNA

Debido a que el mecanismo de RNAi silencia la expresión de genes tanto endógenos como exógenos, se ha explorado esta propiedad como una estrategia de terapia génica y su uso ha permitido tener resultados experimentales significativos en la inhibición de los tumores. Sin embargo, deben analizarse algunos aspectos que son importantes para la generación de modelos eficientes con el uso de siRNA. Por lo tanto, a continuación se describen los criterios más relevantes a considerar para el diseño, generación, funcionalidad y administración de siRNA en células de mamíferos.

Entre los criterios que deben considerarse para generar siRNA con alta eficiencia para silenciar genes blanco específicos, se encuentran los siguientes:

- Análisis y selección de las secuencias nucleotídicas de DNA a silenciar.
- La longitud de los siRNA no debe exceder de 21 a 25 nucleótidos.
- Se deben evitar en lo posible la formación de estructuras secundarias en la secuencia del mRNA que complementará con los siRNA.
- La homología de secuencias de los siRNA pueden compartir una mínima identidad con otros genes.
- Los siRNA sintéticos deben de ser de doble cadena (dsRNA) para favorecer el acoplamiento con el complejo RISC y con el mRNA específico.

- f) En el diseño de secuencias de DNA que serán usados como insertos de clonación en vectores moleculares, es deseable que se generen transcritos de siRNA con una longitud de 21 a 25 nucleótidos, que el diseño del inserto de clonación contenga la secuencia del siRNA separada por una secuencia espaciadora irrelevante, seguida de la misma secuencia del siRNA repetida e invertida, que el contenido de G/C sea entre 30% a 60%, que la secuencia en el extremo 5' comience con un residuo de G o C después de un dímero de AA, que contenga por lo menos las siguientes bases conservadas: una A en la posición 3, una T en la posición 10, una A en la posición 13, una A en la posición 19; y que contengan de cuatro a seis secuencias de T en el extremo 3' como señal de terminación de la transcripción para la RNA Pol III.⁷⁸⁻⁸² Estas consideraciones pueden favorecer la eficacia de los siRNA para silenciar de manera selectiva y específica la expresión de genes blanco.

Existen por lo menos dos estrategias para generar los siRNA, la primera de ellas es por síntesis química y la segunda estrategia es por clonación en vectores moleculares. Los siRNA de 21 a 25 nucleótidos pueden ser sintetizados químicamente y ser transfectados en las células de mamíferos por lipofección catiónica.⁸³⁻⁸⁵ Con esta estrategia se puede inducir el silenciamiento eficiente de la expresión de genes con siRNA dúplex sintéticos. Sin embargo, la síntesis de siRNA tiene altos costos de producción y en algunas ocasiones se requiere de varias dosis de administración en los modelos *in vivo*.⁸³⁻⁸⁵ La clonación de un inserto de DNA en un vector molecular que será transcrito en el correspondiente siRNA es la segunda manera de producir siRNA y es una herramienta que se ha desarrollado con el uso de plásmidos de expresión de siRNA.^{86, 87} Estos vectores contienen insertos de DNA diseñados con software para generar los siRNA más óptimos para acoplarse con el complejo RISC y con los mRNA blanco. Al transfectar los plásmidos en células de mamíferos, los insertos de DNA son transcritos como siRNA bajo el control del promotor de la RNA Pol III del gen H1 o del gen U6, y forman estructuras secundaria tipo tallo-asa que son procesadas por Dicer en el complejo RISC y son acoplados con los mRNA blanco. Adicionalmente, los insertos de DNA pueden estar contenidos en unidades de clonación y ser introducidos en otros vectores moleculares.

Los virus son otro tipo de vectores que han sido explorados para generar siRNA. La amplia variedad de los tipos de virus que existen, así como la amplia

capacidad de infección celular, ha permitido explorar a los virus como vehículos exitosos de expresión de siRNA funcionales. En diferentes tipos de virus se ha generado la transcripción de siRNA acoplados a promotores específico, en donde los siRNA carecen de la señal 5'-cap y de las secuencias 3' de poliadenilación, y están diseñados para ser transcritos por la RNA Pol II; lo cual ha permitido generar siRNA funcionales en diferentes modelos animales.⁸⁸⁻⁹⁵ Por ejemplo, se conoce que los retrovirus son altamente eficientes para inducir una infección durante la transgénesis de siRNA, ya que pueden infectar una amplia variedad de células humanas. Además, los retrovirus tiene la capacidad de integrarse al genoma de las células en replicación, lo cual representa una ventaja cuando se infectan células cancerosas, ya que pueden realizarse transfecciones estables de siRNA. Sin embargo, los retrovirus tienen la desventaja de que se generan en bajos títulos de producción por las células que los empaquetan, y se requiere de un sistema de concentración de partículas virales.⁹⁶ En algunos modelos se ha usado el sistema de liberación de siRNA mediante retrovirus en donde se ha demostrado la expresión estable de los siRNA para silenciar genes específicos blanco.^{86, 97} En relación con el uso de adenovirus, se pueden obtener altos títulos de partículas virales; sin embargo, en la mayoría de los casos, los adenovirus son difíciles de manipular, ya que tienen un genoma de DNA muy grande de varios kilobases. Sin embargo, los adenovirus tienen la capacidad de infectar tanto a células quiescentes como a células en división. Se ha demostrado que los adenovirus modificados para replicarse específicamente en células cancerosas, inducen el silenciamiento de la expresión de genes blanco por siRNA en líneas celulares tumorales.^{98,99} Con respecto a los lentivirus y virus adenoasociados, son otros tipos de vectores para siRNA que se han usado de manera exitosa para silenciar la expresión de genes del sistema nervioso en modelos animales.^{100,101} Por lo tanto, la estrategia de utilizar virus hace posible generar siRNA con características idénticas a los MicroRNAs bioactivos y silenciar la expresión de genes blanco de manera selectiva, eficiente y secuencia-específica en células de mamíferos.

Con estas estrategias se ha demostrado que la producción de siRNA, ya sea sintéticos o bien generados como transcritos de siRNA en vectores moleculares, tienen la capacidad de mimetizar las funciones biológicas de los MicroRNA naturales que se producen durante el silenciamiento de la expresión de genes por el mecanismo de RNAi. Por lo tanto, la selección de la estrategia más adecuada para la generación de siRNA biofuncionales con fines te-

rapéuticos, dependerá de los objetivos de cada protocolo en particular para silenciar la expresión de genes blanco específicos. Además, se sugiere que se consideren los criterios para el diseño, generación, funcionalidad y administración de los siRNA; para tener una mayor probabilidad de éxito para que los siRNA sean funcionales.

SIRNA PARA LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE HPV COMO POTENCIAL TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER CERVICAL

El cáncer cervical es una de las neoplasias de mayor importancia en la salud pública en el mundo debido a las altas tasas de incidencia, de morbilidad y de mortalidad ocasionadas por este tipo de cáncer. Está perfectamente determinado que el principal factor etiológico asociado con el desarrollo del cáncer cervical es la infección persistente por HPV de alto riesgo. Predominantemente, se han identificado los tipos de HPV16 y HPV18 asociados en el desarrollo de lesiones pre-cancerosas y carcinomas ano-genitales, y las oncoproteínas E6 y E7 son el foco de atención para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico y tratamiento para el control del cáncer cervical.^{102,103}

Durante el desarrollo del cáncer cervical un evento característico en las células epiteliales cervicales es la expresión diferencial de los oncogenes de HPV de alto riesgo y alteración de la expresión de los genes celulares. En las células cervicales basales infectadas con HPV, los oncogenes E6 y E7 son expresados en niveles bajos, pero la transcripción de estos oncogenes es activada cuando las células transitan hacia la diferenciación. La proteína E6 de HPV de alto riesgo contiene aproximadamente 150 aminoácidos y tienen dos motivos de dedos de zinc compuestos de cuatro motivos C-X-X-C que son requeridos para las funciones de E6.¹⁰⁴ Uno de los principales blanco bien caracterizado de interacción de E6 de HPV16 y HPV18, es la proteína supresora de tumores p53. El factor de transcripción p53 es el gen supresor de tumores más frecuentemente inactivado en cánceres humanos y está involucrado en el control de la proliferación celular, en la respuesta al estrés genotóxico y en el daño al DNA.^{105,106} La inactivación de p53 por E6 de HPV de alto riesgo tiene efecto en varios procesos celulares como apoptosis, arresto del ciclo celular, senescencia, y diferenciación celular. Los eventos ocurren a través del reclutamiento de la proteína E6AP que es una ligasa de la vía de proteólisis de ubiquitina.¹⁰⁴ El complejo E6-E6AP reconoce a la proteína supresora de tumores p53 y facilita su poli-ubiquitinación e in-

duce su rápida degradación por la vía del proteosoma.¹⁰⁴ Por lo tanto, la pérdida de p53 induce un aumento en la inestabilidad genómica de la célula. Por otra parte, la oncoproteína E7 de HPV de alto riesgo contiene aproximadamente 100 aminoácidos y tiene tres regiones conservadas denominadas CR1, CR2 y CR3; las cuales son críticas para las actividades oncogénicas virales. Las oncoproteínas E7 tanto de HPV de alto riesgo como de HPV de bajo riesgo pueden interaccionar con la proteína supresoras de tumores pRb; sin embargo, E7 de HPVs de alto riesgo tiene mayor afinidad por pRb que E7 de HPVs de bajo riesgo.^{104,107} Las interacciones ocurren inicialmente con la forma hipofosforilada de pRb, lo cual induce la liberación de los factores de transcripción de la familia de E2F, con la consecuente estimulación de la expresión de múltiples genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Además de estas asociaciones, se han reportado que existen otras interacciones importantes de las oncoproteínas E6 y E7 con proteínas celulares, como son con AP-1,¹⁰⁸ con c-myc,¹⁰⁹ con Epoc-1,¹¹⁰ con p21-CIP1/WAF1, con p27-Kip1,¹¹¹ y con TBP.^{112,113} Adicionalmente al potencial oncogénico y anti-apoptótico de las oncoproteínas E6 y E7, se ha demostrado que estas oncoproteínas pueden modular la transcripción de genes tanto virales como celulares.^{114,115} Nosotros hemos reportado que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 pueden trans-activar el gen de TGF-beta1 y potencialmente influir en la regulación de la respuesta inmune anti-tumoral.¹¹⁶ Por lo tanto, E6 y E7 de HPV ejercen sus efectos en varios niveles de las funciones celulares como en el control del ciclo celular, en la regulación de la expresión de genes, en la desregulación de la respuesta inmune anti-tumoral; y en combinación ambas oncoproteínas pueden eficientemente transformar e inmortalizar a los queratinocitos humanos normales durante el proceso de carcinogénesis cervical.^{117,118} Estos hallazgos permiten proponer a los oncogenes E6 y E7 de HPV como genes blanco para dirigir estrategias de terapia génica contra el cáncer cervical.

El RNAi puede silenciar la expresión de genes que codifican para antígenos tumorales u oncogenes virales, con el propósito de reprimir la proliferación específica de las células cancerosas. En consecuencia, el silenciamiento de genes por RNAi es un mecanismo potencial para inactivar secuencias foráneas de DNA, y representa una exitosa estrategia para silenciar la expresión de los oncogenes del HPV en el cáncer cervical. Los hallazgos reportados por varios grupos en este tipo de estudios se resumen en el cuadro 1. Los primeros estudios realizados con siRNA sintéticos para inducir el silenciamiento de la expre-

Cuadro 1. Silenciamiento de la expresión de los oncogenes de E6 y E7 de HPV con siRNA.

Oncogénesis de HPV	Diseño de siRNA	Efectos biológicos	Referencias
E6 y E7 de HPV16	siRNA sintéticos.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Expresión de p53 y p21. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> .	119
E6 de HPV16	siRNA sintéticos.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Expresión de p53 y p21 y pRb. Inhibición de la proliferación celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	120
E6 de HPV18	siRNA sintéticos.	Silenciamiento de E6 de HPV16. Expresión de p53, p21 y pRb. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> .	121
E7 de HPV16	siRNA sintéticos en geles bio-adhesivos.	Silenciamiento de E7 de HPV16. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> .	126
E6 y E7 de HPV18	siRNA sintéticos con quimioterapia.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV18. Expresión de p53. Disminución de la citotoxicidad <i>in vitro</i> .	124
E6 de HPV18	siRNA en lentivirus con quimioterapia.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV18. Expresión de p53. Disminución de la citotoxicidad <i>in vitro</i> .	125
E6 y E7 de HPV16	siRNA sintéticos con liposomas.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	127
E6 y E7 de HPV18	siRNA con atelocolágena.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV18. Expresión de p53 y pRb. Inducción de senescencia celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	128
E6 y E7 de HPV18	siRNA sintéticos.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV18 y ciclina A. Expresión de p53, pRb, p16, p21, p27. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> .	122
E6 y E7 de HPV18	siRNA en el plásmido pSUPER.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV18. Expresión de p53 y p21. Análisis de la expresión del transcriptoma de células cancerosas.	133
E6 y E7 de HPV16	siRNA en el plásmido psiCheck2.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Expresión de p53 y p21. Inducción de senescencia celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	135
E7 de HPV16	siRNA en el plásmidos pSIRE-DNR.	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Expresión de p53, p21 y pRb. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> .	137
E6 y E7 de HPV	siRNA en lentivirus de alto riesgo	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV16. Expresión de p53 y p21. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Mayor eficiencia de infección en células en proliferación y en reposo.	129
Gen <i>hTERT</i>	siRNA en pSilencer 4.1-CMVneo	Silenciamiento del gen <i>Htert</i> , disminución de la actividad de telomerasa, inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis de las células tumorales. Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	131

sión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 fueron desarrollados por Jiang *et al.*; en el 2002.¹¹⁹ En este estudio los autores demostraron el efecto biológico de los siRNA en células humanas de carcinoma cervical. La administración de los siRNA produjo la degradación del mRNA y el silenciamiento específico de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16. Además, el silenciamiento de E6 indujo la expresión del gen p53; trans-activación del gen inhibidor de ciclinas-cinasas p21-CIP1/WAF1, y disminución de la proliferación celular; mientras que el silenciamiento de E7 indujo la muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, los hallazgos reportados por este grupo demuestran por primera vez que la expresión de los oncogenes E6 y E7 puede ser silenciada por siRNA de manera específica en células cervicales tumorales humanas transformadas por HPV.

Silenciamiento con siRNAs del bicistrón E6-E7 de HPV

Un aspecto en el que se ha centrado la atención del uso de siRNA para los oncogenes E6 y E7 de HPV es en el efecto que tienen para silenciar el bicistrón E6-E7; ya que estos oncogenes se transcriben de manera conjunta en forma de un bicistrón, producto del splicing alternativo que ocurre entre estos genes. En este sentido se ha reportado el efecto de siRNA sintéticos para el oncogén E6 de HPV16 en células SiHa (HPV16+) y se ha observado el silenciamiento de ambos oncogenes E6 y E7.¹²⁰ Además, se ha observado la inhibición de la proliferación celular, la expresión de la proteína p53, la inducción del gen p21-CIP1/WAF1, y la identificación de la forma hipofosforilada de pRb que corresponde a su forma activa y disociada del factor de transcripción E2F. Además, cuando las células SiHa fueron inoculadas en ratones inmunodeficientes (SCID) y tratados con los siRNA para E6, se identificó una disminución de la capacidad de las células cancerosas para inducir la formación de tumores en los animales. Por lo tanto, los hallazgos reportados por este grupo demuestran que los siRNA para E6 de HPV16 tienen efecto sobre el bicistrón E6-E7 tanto *in vitro* como *in vivo*.

Otro grupo ha reportado el uso de siRNA sintéticos para el oncogén E6 de HPV18.¹²¹ En este estudio se demostró la inducción de apoptosis de las células CaSki (HPV18+), el aumento de la expresión de p53 y de p21-CIP1/WAF1, y la expresión de la forma hipofosforilada de pRb. Un hallazgo que llamó la atención en este estudio fue que los siRNA para E6 de HPV18 no afectaron la expresión del oncogén E7 de HPV18. De primera instancia, esta observación

parece estar en contradicción con lo reportado por Jiang *et al.*; en donde se demuestra que los siRNA para el oncogén E6 tienen un efecto para ambos oncogenes.¹¹⁹ Sin embargo, estos datos no son totalmente contradictorios ya que pueden ser explicados por el diseño de las secuencias nucleotídicas de los siRNA. Al analizar ambos estudios con mayor profundidad, se puede apreciar que el diseño de los siRNA está dirigido a secuencias diferentes del oncogén E6, lo cual sugiere un efecto de silenciamiento dependiente de la posición de complementariedad de bases entre el siRNA y el mRNA. Por lo tanto, el silenciamiento del transcrito bicistrónico E6-E7 es dependiente del diseño de las secuencias de siRNA para los oncogenes E6 y E7 de HPV.

Con la intención de analizar el efecto del silenciamiento del bicistrón E6-E7 de HPV18, se ha reportado que la administración de siRNA específicos para E7 induce el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7; mientras que siRNA para E6 únicamente inhiben la expresión de E6, pero no tiene efectos sobre la expresión de E7.¹²² Al analizar el diseño de las secuencias de siRNA para E7 se observa que la complementariedad de bases con el mRNA respectivo ocurre en una posición que afecta la expresión del bicistrón E6-E7, sin embargo los siRNA para E6 complementan con el mRNA en una secuencia que no influye para silenciar el transcrito bicistrónico E6-E7. Nuevamente, estas evidencias soportan el hecho de que el silenciamiento del bicistrón E6-E7 es dependiente del diseño de las secuencias de siRNA y se sugiere que los eventos de splicing alternativo de los oncogenes E6 y E7 de HPV preceden a los eventos de silenciamiento por siRNA. Adicionalmente en este mismo estudio se analizó la funcionalidad de los siRNA para E6 y E7 y se demostró la inducción de la expresión de p53, p16, p21, p27 y de pRb hipofosforilada; el silenciamiento del gen de ciclina A, y la inducción de apoptosis de las células cancerosas. Estas evidencias fortalecen el hecho de que las oncoproteínas virales pueden tener propiedades anti-apoptóticas por la influencia que tienen en las funciones de p53, y que cuando los oncogenes se silencian con siRNA, se restablece las funciones de p53 sobre el control del ciclo celular y la apoptosis.¹²³ Por lo tanto, este escenario representa una ventaja terapéutica en comparación con el uso de agentes quimioterapéuticos que solo inhiben la proliferación celular.

Agentes quimioterapéuticos y siRNA para E6 y E7 de HPV

Aunque se conoce el efecto de diferentes drogas quimioterapéuticas sobre la expresión de la proteína

p53 en células cervicales tumorales humanas, se desconoce si hay una asociación entre la activación del gen p53, el efecto citotóxico de las drogas y el silenciamiento de los oncogenes de HPV con siRNA. Por lo tanto, se ha analizado en células HeLa (HPV18+) la expresión de la proteína p53 por la administración de siRNA para el oncogén E6 de HPV18 en combinación con el tratamiento con carboplatino, cisplatino, doxorubicino, etopósido, gemcitabina, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, y topotecano.¹²⁴ En este estudio se observó el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV18, así como aumento de la expresión de la proteína p53, y cambios en la citotoxicidad que fueron dependientes de la naturaleza de cada compuesto quimioterapéutico. Adicionalmente, otro grupo demostró en células HeLa, que la administración de siRNA específicos para E6 de HPV18 generados en lentivirus, en combinación con el cisplatino, la droga más frecuentemente usada para el tratamiento del cáncer cervical avanzado; produce el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV18, aumento de la expresión de p53, y muerte de las células cancerosas por senescencia celular.¹²⁵ Estas evidencias sugieren que el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 por siRNA puede aumentar la sensibilidad de las células a los efectos citotóxicos de las drogas; y que el tratamiento combinado puede tener efectos sinérgicos para disminuir los efectos de resistencia a las drogas quimioterapéuticas, lo cual representa una ventaja de tratamiento.

Moléculas transportadoras de siRNAs para E6 y E7 de HPV

En la evaluación de los efectos biológicos de los siRNA tanto *in vitro* como *in vivo*, se han desarrollado protocolos de administración de siRNA sintéticos para los oncogenes E6 y E7 acoplados a liposomas como vehículos de transporte.¹²⁶ En estos estudios se ha demostrado en células CaSki (HPV16+) que al administrar siRNA para E6 y E7 de HPV16 se induce el silenciamiento de ambos oncogenes y las células cancerosa mueren por apoptosis. Con este mismo sistema y mediante el desarrollo de un modelo tumoral murino con células CaSki, se ha evaluado los efectos de siRNA para E6, y se ha determinado el silenciamiento del oncogén viral, la inducción de apoptosis de las células cancerosas y una inhibición significativa del crecimiento de la masa tumoral *in vivo*.¹²⁶ Aunque estos hallazgos son significativos, cuando se usan siRNA sintéticos y son administrados por lipofección a las células de mamíferos, un potencial problema que se presenta es la degrada-

ción de los siRNA por la acción de las endonucleasas celulares endógenas. Un diseño alternativo para proteger a los siRNA de esta degradación es la síntesis de siRNA con modificaciones químicas, sin embargo esto puede inducir efectos colaterales no deseables. Además, otro problema que se presenta en la administración sistémica de siRNA es que no se tiene un efecto dosis dependiente en los órganos blancos de interés. Por lo tanto, para superar estos inconvenientes metodológicos, se ha reportado que los siRNA específicos para los oncogenes de HPV pueden ser administrados en un sistema basado en liposomas contenidos en biogeles.¹²⁷ La combinación de biogeles adhesivos con liposomas que contienen los siRNA para el oncogén E7 de HPV16 ha demostrado el silenciamiento específico de E7 y la inducción de apoptosis de las células cancerosas *in vitro*. Adicionalmente se ha reportado también el uso la atelocolágena (una colágena tipo I purificada de dermis de cabra y tratada con pepsina) como vehículo para administrar los siRNA para E6 y E7 de HPV18 tanto *in vitro* como *in vivo*.¹²⁸ En este estudio se observó que los siRNA silencian la expresión de E6 y E7, inhiben la proliferación celular, inducen la expresión de la forma hipofosforilada de pRb, e inducen la muerte de las células cancerosas por senescencia celular. Además, se demostró en este mismo sistema que la administración de los siRNA para E6 y E7 de HPV18 acoplados a la atelocolágena, inhiben el crecimiento de la masa tumoral en un modelo tumoral murino.¹²⁸

Aunque son evidentes los efectos de silenciamiento de los siRNA sintéticos, la vida media de estas moléculas después de su administración es relativamente corta, aun cuando se acoplen a moléculas transportadoras; lo cual limita su aplicación en tratamientos preclínicos o clínicos. Además, la aplicación real de siRNA para los oncogenes E6 y E7 de HPV de alto riesgo en estudios de fase clínica, requiere de un mejor entendimiento en el desarrollo de siRNA altamente específicos y mayor eficiencia en los sistemas de liberación *in vivo*. En este sentido, se han desarrollado protocolos para la generación de lentivirus como vectores moleculares de liberación de siRNA específicos para los oncogenes E6 y E7 de HPV de alto riesgo, así como la transfección estable y transducción en células cervicales tumorales humanas y la evaluación de los efectos biológicos por el silenciamiento con los siRNA tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.¹²⁹ El uso de plásmidos para clonar los siRNA proporciona una mayor vida media y mayor estabilidad a estas moléculas, y el vehículo molecular más eficiente para liberar estos plásmidos

son los lentivirus. Las ventajas de usar lentivirus como sistemas de liberación de genes, incluyen la habilidad para infectar con alta eficiencia a células en división y células en reposo, no son tóxicos, son poco inmunogénicos, han sido modificados para no integrarse al genoma celular y han sido explorados para sus aplicaciones en protocolos preclínicos y clínicos con resultados promisorios.¹³⁰ Por estas características, los siRNA para los oncogenes de HPV de alto riesgo generados en lentivirus, han demostrado tener una mayor utilidad comparativamente que los siRNA sintéticos.¹²⁹ Por lo tanto, con el uso de estas estrategias se han superado los problemas metodológicos para la liberación tópica de los siRNA en los órganos específicos, se obtiene una administración dosificada de los siRNA, y se protegen a los siRNA de la degradación por las endonucleasas *in vitro* e *in vivo*. Estas estrategias por lo tanto ofrecen ventajas de administración de los siRNA para los oncogenes virales que son aplicados directamente en los sitios del tumor.

Silenciamiento del gen *hTERT* con siRNA en células de cáncer cervical

Interesantemente, también se ha documentado el uso de siRNA para silenciar la expresión de una enzima que tienen actividad relevante durante el desarrollo del cáncer cervical, y que corresponde a la telomerasa (reverso transcriptasa telomerasa *hTERT*),¹³¹ la cual sintetiza a los telómeros en los cromosomas de los eucariontes, para mantenerlos protegidos de la degradación, fusión y recombinación; y en consecuencia mantener la estabilidad genómica. En la mayoría de las células somáticas la actividad de la telomerasa está ausente o es muy baja, mientras que en células no diferenciadas o inmortales como en el cáncer cervical, la actividad de la telomerasa aumenta considerablemente. Los siRNA para la telomerasa fueron clonados en el vector pSilencer 4.1-CMVneo, el cual aunque pertenece a la familia de plásmidos pSilencer y comparte características similares para generar transcritos de siRNA funcionales en células de mamíferos, tiene un promotor para la RNA Pol II y contiene el marcador genético de selección para G418 para generar transfecciones estables. Además, las construcciones de plásmidos de siRNA para *hTERT* están bajo el control del promotor de survivin, el cual es reconocido por la RNA Pol II. El gen de survivin codifica para un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis y ha sido identificada en la mayoría de las células de cánceres humanos.¹³² Debido a que

el gen de la telomerasa es considerado como un blanco ideal para el desarrollo de terapia génica contra cáncer, los plásmidos de siRNA para *hTERT* fueron transfectados en células HeLa para inducir el silenciamiento del gen *hTERT*. Los resultados obtenidos exhibieron un efecto de silenciamiento de la expresión del gen *hTERT* y de la proteína de telomerasa, disminución de la actividad de telomerasa, inhibición de la proliferación celular, bloqueo de la transición de la fase G1 a la fase G0 del ciclo celular, aumento de la actividad de caspasa 3, y como consecuencia la muerte de las células tumorales por apoptosis.¹³¹ En el modelo tumoral animal, se observó regresión del proceso tumoral en los ratones con xenotrasplantes de tumor. Adicionalmente, se ha reportado una relación entre la sensibilidad a la radioterapia y la actividad de telomerasa en diferentes tipos de cánceres. Para el caso del cáncer cervical se ha observado resistencia a la radioterapia con la disminución de la actividad de telomerasa. En este sentido, en este estudio se identificó que las células HeLa tienen una mayor sensibilidad a la radioterapia cuando se silenció la expresión de *hTERT* con siRNA. Estos hallazgos soportan la noción de que el diseño y administración exógena de plásmidos de siRNA específicos para el gen *hTERT* bajo el control de promotores blanco para la RNA Pol II, silencian la expresión de telomerasa, y representan una potencial estrategia en los protocolos de terapia con radiación de los tumores cervicales humanos.

Regulación del transcriptoma por efecto de siRNA para E6 y E7 de HPV

Otro aspecto que se ha estudiado por el silenciamiento de los oncogenes de E6 y E7 de HPV con el uso de siRNA, es el efecto que tiene en la regulación del transcriptoma de las células tumorales cervicales humanas. En el 2007 Kuner *et al.*¹³³ analizaron el transcriptoma de células HeLa y de biopsias de pacientes al inducir el silenciamiento de E6 y E7 de HPV18 con siRNA generados en el plásmido de silenciamiento pSUPER. En este estudio se identificaron 360 genes celulares con una regulación negativa y 288 genes con una regulación positiva por el efecto de los siRNA para E6 y E7. La mayoría de estos genes están involucrados en procesos biológicos relevantes durante el desarrollo de la célula tumoral, tales como: control de la apoptosis, regulación del ciclo celular, formación del uso mitótico, procesamiento de mRNA por splicing, metabolismo, replicación y reparación de DNA, transporte nuclear, proliferación celular y

genes regulados por c-Myc. Estos hallazgos son complementarios a estudios previos en donde se ha analizado la expresión de la proteína E2 de HPV, la cual inhibe la expresión de E6 y E7 de HPV, y la expresión del transcriptoma en células cervicales tumorales humanas. El potencial de este tipo de estudios radica en que se pueden identificar vías celulares esenciales para la transformación viral, las cuales pueden ser blanco para el desarrollo de estrategias terapéuticas; así como nuevos biomarcadores moleculares para el diagnóstico y pronóstico del cáncer cervical. Un ejemplo de estos biomarcadores es el enhancer del gen 2 homólogo a Zeste (EZH2), el cual es reprimido por la inhibición de E6 y E7 por siRNA, lo que sugiere que este biomarcador está activo en las células de cáncer cervical transformadas por HPV.¹³³ Por lo tanto, la información generada por el estudio del transcriptoma de las células de cáncer cervical con el uso de siRNA para los oncogenes de HPV puede contribuir para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta neoplasia.

Diseño de secuencias de siRNA para E6 y E7 de HPV con el uso de software

Actualmente, se han desarrollado programas computacionales en diferentes software disponibles en diferentes sitios web, que permiten hacer el diseño de secuencias de siRNA más eficientes y biológicamente funcionales. En este sentido, se ha reportado el uso del software siDirect (<http://design.RNAi.jp/>)¹³⁴ para el diseño de secuencias de siRNA altamente eficientes, con alta especificidad por la secuencia blanco, para silenciar la expresión de genes por RNAi en células de mamífero. Las secuencias de los siRNA altamente eficientes, son seleccionadas a partir del algoritmo basado en las reglas desarrolladas por Ui-Tei *et al.*⁸² Estas reglas indican que deben de cumplirse las siguientes cuatro condiciones de manera simultánea:

1. La cadena antisentido del siRNA debe de comenzar en el extremo 5' con una secuencia A/U.
2. La cadena complementaria sentido del siRNA debe comenzar en el extremo 5' con una secuencia G/C.
3. La cadena antisentido debe contener una región relativamente rica de secuencias AU en el tercer tercio del extremo 5'.
4. La secuencia del siRNA no debe contener secuencias estrechas de GC mayores a nueve nucleótidos de longitud.

Estas reglas están fundamentadas en la literatura para que los siRNA tengan un acoplamiento eficiente y funcional con el complejo RISC. Adicionalmente, en el diseño de las secuencias siRNA, el software siDirect minimiza la complementariedad inespecífica de las secuencias de siRNA, lo que reduce la complementariedad con secuencias no relacionadas. Para el cumplimiento de este requisito, el software siDirect usa una medida de especificidad rigurosa denominada tolerancia de complementariedad inespecífica (mismatch tolerance) y que consiste en identificar el número mínimo de inespecificidades entre las secuencias de siRNA y cualquier secuencia que no corresponda a la secuencia blanco. Por lo tanto, una alta especificidad de complementariedad de las secuencias de siRNA tendrá una alta probabilidad de hibridar con la secuencia blanco en presencia de secuencias inespecíficas. Se ha reportado el uso del software siDirect para generar un conjunto de varias secuencias de siRNA para los oncogenes E6 y E7 de HPV16¹³⁵, las cuales tienen las siguientes características:

- Los siRNA están diseñados para incluir a todas las variantes de HPV16, así como las isoformas de los oncogenes generadas por splicing alternativo para silenciar el bicistrón E6-E7.
- Las secuencias de los siRNA son potencialmente factibles de acoplarse con el complejo RISC.
- Los siRNA tienen un mínimo de complementariedad con mRNA blanco inespecíficos de una base de datos de secuencias no redundantes de genes humanos.

De estos análisis se han reportado un conjunto de varias secuencias de DNA que transcriben para los siRNA específicos para E6 y E7. Para evaluar la funcionalidad de los siRNA, los insertos de DNA fueron clonados en el plásmido de silenciamiento psiCheck2. Con esta estrategia se ha demostrado una alta especificidad para silenciar los oncogenes E6 y E7, una considerable supresión de la proliferación de células cervicales tumorales HPV16+, un aumento de la expresión de p53 y p21-CIP1/WAF1; así como cambios morfológicos e histoquímicos característicos de la muerte de las células cancerosas por senescencia celular. Además, se demostró la funcionalidad *in vivo* de los siRNA por la inhibición del crecimiento de tumores en un modelo animal tumoral HPV16+.¹³⁵ Estas evidencias soportan la noción que el diseño de siRNA generados con software son funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* para silenciar la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV,

y tienen efectos biológicos en las células cervicales cancerosas.

Adicionalmente, nuestro grupo también ha desarrollado un protocolo para silenciar la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 con el uso de siRNA (datos en proceso de publicación). En este estudio se decidió diseñar los siRNA para E6 y E7 de HPV16 con el software siRNA Target Finder de Ambion.¹³⁶ Este software emplea las reglas básicas para el diseño de siRNA descritas en la literatura y complementadas por investigadores de Ambion. Estas reglas indican que:

1. Se hace una búsqueda de 21 nucleótidos en el mRNA blanco que comience con un dinucleótido AA seguido de 19 nucleótidos adyacentes como potenciales sitios blanco para siRNA.
2. Es deseable que la secuencia de los siRNA tenga una longitud entre 21-25 nucleótidos, que el contenido de G/C sea entre 30% a 60%, que la secuencia en el extremo 5' comience con un residuo de G o C seguido del dímero de AA, y que contenga por lo menos las siguientes bases conservadas: una A en la posición 3, una T en la posición 10, una A en la posición 13, una A en la posición 19.
3. Se deben de seleccionar de dos a cuatro secuencias de siRNA candidatos, ya que se ha observado que la mitad de los siRNA diseñados azarosamente inducen el silenciamiento aproximadamente del 50% de los niveles de mRNA blanco; y la selección de 1 a 4 secuencias de siRNA tienen la capacidad de inducir del 75-95% de silenciamiento del mRNA blanco.

Con el uso del software siRNA Target Finder de Ambion se diseñaron los siRNA para E6 y E7 de HPV16 para clonarlos en el plásmido pSilencer 1.0-U6, el cual contiene el promotor U6 que es reconocido por la RNA Pol III.

La ventaja de usar este tipo de plásmido consiste en que se generan transcritos pequeños por la RNA Pol III, tienen una secuencia de término y la expresión de los siRNAs es más estable comparativamente que los siRNAs sintéticos. Con este sistema se evaluó el efecto biológico que tienen los siRNA en células SiHa y se demostró el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV16, y la inducción de apoptosis de las células cancerosas. En este momento se encuentran en desarrollo el análisis de la funcionalidad de los siRNA *in vivo* en un modelo animal tumoral HPV16+. Adicionalmente, otro grupo ha reportado la generación de siRNA para E7 de

HPV16 en el plásmido pSIRE-DNR¹³⁷ el cual tiene características similares al plásmido pSilencer 1.0-U6 para generar transcritos pequeños. En este estudio los autores demostraron el silenciamiento del bicistrón E6-E7 de HPV16 en células SiHa y CaSki, el aumento de la expresión de p53, p21 y pRb hipofosforilada, y la inducción de la muerte de las células cervicales tumorales por apoptosis.

Con respecto a los software que se utilicen para el diseño de las secuencias de siRNA, dependerá de los objetivos de cada protocolo de investigación. Sin embargo, es importante considerar que los diferentes software disponibles en los diferentes sitios web, tienen sus particularidades. La mayoría de los sitios web para el diseño de las secuencias de siRNA (siRNA Target Finder de Ambion, siDESIGN Center de Dharmacon, siRNA Target Finder de Gen Script, y Gene Specific siRNA selector) utilizan la plataforma de BLAST para identificar secuencias inespecíficas. Por lo tanto, es importante considerar que por las limitaciones de BLAST en la búsqueda de alineamientos óptimos, no puede minimizar los efectos de silenciamiento de secuencias inespecíficas. Comparativamente, el software siDirect utiliza algoritmos más eficientes para la especificidad de complementariedad de secuencias (mismatch tolerance).

En conjunto, estas evidencias soportan la noción de que la administración de los siRNA específicos para los oncogenes E6 y E7 de HPV, inducen el silenciamiento de la expresión de estos oncogenes virales. Adicionalmente, los siRNA tienen efectos biológicos en las células cervicales tumorales humanas transformadas por HPV, como son en la activación de la muerte celular por apoptosis, en la senescencia celular, en la citotoxicidad inducida por drogas utilizadas en la quimioterapia del cáncer cervical; y en la inhibición de la capacidad de las células cancerosas para inducir tumores *in vivo*. La relevancia de estas propiedades de silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 será mejor apreciada cuando se realice su aplicación en protocolos clínicos; lo que implicará un adecuado análisis en el diseño de las secuencias de los siRNA para inducir el silenciamiento del bicistrón E6-E7; en la selección adecuada de los vectores de clonación de los siRNA; en la selección de los vehículos de transporte de los siRNA como biogeles o atelocolágena para protegerlos de la acción de las endonucleasas y para administrarlos de manera sitio-específico y dosis-dependiente; así como el diseño de esquemas de tratamiento combinado con el uso de siRNA, drogas de quimioterapia o esquemas de radioterapia. Por lo tanto, el uso de la tecnología de RNAi como una estrategia de terapia génica contra

el cáncer cervical, tiene un alto potencial de éxito para el tratamiento de este tipo de cáncer en particular.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El mecanismo de RNAi es un proceso endógeno, natural por el cual las células de los eucariontes silencian a nivel post-transcripcional la expresión de genes cuando ocurre la complementariedad de bases nucleotídicas entre los MicroRNAs con el mRNA. Este mecanismo probablemente evolucionó como parte de los mecanismos de defensa de las células huésped para contra-restar las infecciones virales o elementos genéticos exógenos que utilizan dsRNA durante alguna fase de su ciclo de vida. Se trata de un mecanismo ancestral identificado tanto en el reino vegetal como en el reino animal. Por lo tanto, la identificación del mecanismo de RNAi ha modificado el modelo de razonamiento en el sentido de que el RNA tiene un impacto relevante en la regulación de la expresión de genes, adicional a las funciones previamente identificadas para el RNA como son:

- Ser el intermediario en el flujo de la información genética (transcripción del mRNA).
- Funcionar como componente estructural en la maquinaria molecular de la expresión de proteínas (rRNA y tRNA).
- Tener funciones auto-catalíticas (snPRNs).

Debido a las características de interacción secuencia-específica de los siRNA con los mRNA blanco, es factible que la tecnología de RNAi pueda ser usada en el desarrollo y aplicación de estrategias terapéuticas. Por lo tanto, los siRNA representan potenciales moléculas terapéuticas debido a sus propiedades de silenciar el patrón de expresión de genes endógenos o exógenos de manera específica. El efecto de silenciamiento tiene como fundamento el hecho de que las aplicaciones de siRNA exógenos sólo silencian a genes específicos, y no tiene efectos colaterales por una deficiente complementariedad de bases nucleotídicas con otros genes, por unión a proteínas, o por interacción con los ácidos nucleicos.

Aunque la tecnología del RNAi seguramente no va a remplazar a otras tecnologías existentes como la de *knockout* de genes, podría tener un gran impacto para aquellos organismos o condiciones que no son accesibles a las estrategias de *knockout* de genes. Además, el RNAi puede ser un método para estudiar funciones simultáneas de genes análogos, en organismos en los cuales existe redundancia de

una función en particular, ya que estos genes pueden ser silenciados de manera simultánea por el uso de siRNA. Otra de las aplicaciones del uso de la tecnología del RNAi, es como estrategia rápida y eficaz para analizar las funciones de un gran número de genes en una amplia variedad de organismos. Adicionalmente, otra aplicación del RNAi consiste en la generación y selección de drogas quimioterapéuticas por la identificación de genes que pueden conferir resistencia a drogas; o bien la utilización de manera conjunta de siRNA con esquemas quimioterapéuticos. Este conocimiento podría generar información de los mecanismos de acción de nuevos fármacos terapéuticos y de los efectos de reducción de la citotoxicidad.

En particular para el caso del cáncer cervical, muchos estudios se han realizado y se han descrito notables éxitos en la inducción de la muerte de las células cancerosas en cultivo por la administración de siRNA específicos para los oncogenes E6 y E7 tanto de HPV16 como de HPV18. Sin embargo, pocos protocolos están complementados con modelos tumorales animales en los cuales se demuestre la erradicación de los tumores una vez que están establecidos; lo cual representa una condición necesaria de evaluación *in vivo* antes de usar la tecnología de RNAi en estudios clínicos en humanos. Otro aspecto que requiere ser analizado con mayor profundidad, es el referente a la habilidad de liberación de las cantidades y eficiencia de los siRNA para un tumor en particular. Aunque los primeros estudios del mecanismo de RNAi contra el cáncer cervical usaron siRNA sintetizados químicamente, los subsecuentes reportes han usado plásmidos o vectores virales para inducir la transcripción de siRNA bioactivos con efectos en la supresión de la evolución tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Con el uso de estos vectores moleculares, la expresión de los oncogenes de HPV fue inhibida de manera más eficiente. La liberación específica de los siRNA aun es una condición limitante en los diferentes modelos de estudio. El uso de biogeles adhesivos conjugados con liposomas y atelocolágena, ha resultado en mayores beneficios con una mayor eficiencia de liberación y dosificación de siRNA en el sitio del tumor. En conjunto, estas evidencias soportan el hecho de que el uso de siRNA tiene un gran potencial para el tratamiento de enfermedades que tienen una asociación y/o etiología viral. Por lo tanto, no hay duda y es contundente el hecho de que la tecnología del RNAi es una estrategia real de terapia génica contra el desarrollo del cáncer cervical. El reto ahora es desarrollar estrategias más eficientes para aplicar esta tecnología en los protocolos clínicos en humanos.

AGRADECIMIENTOS

El presente artículo fue realizado en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud Pública y fue apoyado por un financiamiento federal del propio instituto, así como por los financiamientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de expedientes: SALUD-2008-01-87130 y SALUD-2009-01-111892. Oscar Peralta Zaragoza y Víctor Hugo Bermúdez Morales son becarios del CONACyT con los números de expedientes 117983 y 125098, respectivamente.

ABREVIATURAS

- **(Ago2)**: Proteína argonauta 2.
- **(CaCU)**: Cáncer cérvico uterino.
- **(cDNA)**: DNA complementario.
- **(CIP)**: Proteína inhibidora de ciclinas cinasas.
- **(DGCR8)**: Gen deletado del síndrome de Di George.
- **(dsRBD)**: Dominio de unión al RNA de doble cadena.
- **(dsRNA)**: RNA de doble cadena.
- **(E6AP)**: Proteína asociada a la oncoproteína E6.
- **(HPV)**: Virus de papiloma humano.
- **(Kip)**: Proteína inhibidora de cinasas.
- **(miRNA)**: MicroRNA.
- **(mRNA)**: RNA mensajero.
- **(PID)**: Dominio de interacción de proteínas de Dicer.
- **(pre-miRNA)**: MicroRNA precursor.
- **(pri-miRNA)**: MicroRNA primario.
- **(PIWI)**: Dominio con actividad de RNase H de la proteína Ago2.
- **(R2D2)**: Proteína con dos dominios de unión a dsRNA.
- **(Ran-GTP)**: Factor Ran intercambiador de nucleótidos de guanina.
- **(RDE4)**: Proteína de unión a dsRNA pequeños.
- **(RISC)**: Complejo de silenciamiento inducido por RNAi.
- **(RNAi)**: RNA de interferencia.
- **(rRNA)**: RNA ribosomal.
- **(SCID)**: Inmunidad combinada severa.
- **(siRNA)**: RNA pequeños de interferencia.
- **(stRNA)**: RNA pequeños temporales.
- **(TBP)**: Proteína de unión a la secuencia TATA.
- **(TGF-beta1)**: Factor de crecimiento transformante beta 1.
- **(TRBP)**: Proteína de unión al RNA de respuesta a la trans-activación.

- **(tRNA)**: RNA de transferencia.
- **(UTR)**: Región no traducida.

REFERENCIAS

1. 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. *Plant Cell* 1990; 2: 279-89.
2. 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: 806-11.
3. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438-42.
4. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.
5. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.
6. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.
7. Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 489-519.
8. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 342-350.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189: 12-19.
10. Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Revista Salud Pública de México* 2005; 47: 458-68.
11. Zheng YF, Rao ZG, Zhang JR. Effects of anti-HPV16 E6-ribozyme on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell line CaSki. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22: 496-8.
12. Choo CK, Ling MT, Suen CK, Chan KW, Kwong YL. Retrovirus-mediated delivery of HPV16 E7 antisense RNA inhibited tumorigenicity of CaSki cells. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 293-301.
13. Storey A, Oates D, Banks L, Crawford L, Crook T. Anti-sense phosphorothioate oligonucleotides have both specific and non-specific effects on cells containing human papillomavirus type 16. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4109-14.
14. 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: 494-8.
15. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-88.
16. Bartel PD. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
17. Johnson SM, Lin SY, Slack FJ. The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol* 2003; 259: 364-79.
18. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-9.
19. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.
20. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-40.

21. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*. 2004; 18: 3016-27.
22. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology*. 2004; 14: 2162-7.
23. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10: 1957-66.
24. 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: 415-19.
25. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal* 2002; 21: 4663-70.
26. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biology* 2002; 156: 53-64.
27. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* 2003; 17: 3011-16.
28. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-91.
29. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.
30. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 293: 2269-71.
31. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001; 15: 2654-9.
32. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.
33. Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 2002; 21: 5864-74.
34. 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: 5875-85.
35. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.
36. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-40.
37. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-74.
38. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107: 309-21.
39. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293: 1146-50.
40. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2000; 16: 720-8.
41. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
42. 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.
43. Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 127-38.
44. Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 2005; 122: 17-20.
45. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ et al. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-41.
46. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-97.
47. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004; 305: 1434-7.
48. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* 2005; 434: 666-70.
49. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Purified Argonaute 2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 340-9.
50. Haley B, Zamore PD. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 599-606.
51. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 2004; 18: 1655-66.
52. Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* 2005; 19: 1674-9.
53. Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 2005; 3: 1202-12.
54. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 2002; 109: 861-71.
55. Tabbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman TC. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* 2004; 5: 189-94.
56. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4.
57. Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X, R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 2003; 301: 1921-5.
58. Grishok A, Tabara H, Mello CC. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 2000; 287: 2494-7.
59. 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.
60. Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 2004; 306: 1377-80.
61. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57-68.
62. Doi N, Zenno S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K, Saigo K. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol* 2003; 13: 41-6.
63. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; 117: 69-81.
64. Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 2008; 320(5879): 1077-81.

65. Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingehayde C, Dus M, Perrimon N, et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 2008; 453(7196): 798-802.
66. Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 2008; 453(7196): 803-6.
67. Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, Siomi H. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature* 2008; 453(7196): 793-7.
68. Okamura K, Balla S, Martin R, Liu N, Lai EC. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nature Struct Mol Biol* 2008; 15: 581-90.
69. Chung WJ, Okamura K, Martin R, Lai EC. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr Biol* 2008; 18: 795-802.
70. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; 99(2): 123-32.
71. Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999; 99: 133-41.
72. Zhou R, Hotta I, Denli AM, Hong P, Perrimon N, Hannon GJ. Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell* 2008; 32(4): 592-99.
73. Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 2005; 3(7): 1187-201.
74. Yang N, Kazazian HHJ. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Struct Mol Bio* 2006; 13: 763-71.
75. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 2008; 453(7194): 534-8.
76. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 2008; 453(7194): 539-43.
77. Sasidharan R, Gerstein M. Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature* 2008; 453: 729-31.
78. Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effectson RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acid Res* 2004; 32: 691-9.
79. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-16.
80. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.
81. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 326-30.
82. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 936-48.
83. Sioud M, Sorensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1220-5.
84. Zhang X, Shan P, Jiang D, Noble PW, Abraham NG, Kappas A, Lee PJ. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 10677-84.
85. Liu C, Shi Y, Han Z, Pan Y, Liu N, Han S, et al. Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 transactivation and increases expression of EPO. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 780-6.
86. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-3.
87. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-20.
88. Pinkenburg O, Platz J, Beisswenger C, Vogelmeier C, Bals R. Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus. *J Virol Meth* 2004; 120: 119-22.
89. Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Keene KM, Franz AW, Beaty BJ, Blair CD, Olson AE. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res* 2004; 102: 65-74.
90. An DS, Xie Y, Mao SH, Morizono K, Kung SJ, Chen IS. Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1207-12.
91. Lee JS, Hmama Z, Mui A, Reiner NE. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by Ialpha, 25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279: 9379-88.
92. Li MJ, Rossi JJ. Lentiviral vector delivery of recombinant small interfering RNA expression cassettes. *Meth Enzymol* 2005; 392: 218-26.
93. Futami T, Miyagishi M, Seki M, Taira K. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucl Acids Res Suppl* 2002; 2: 251-2.
94. Matsukura S, Jones PA, Takai D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 77-81.
95. van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 2003; 4: 609-15.
96. de Felipe P, Izquierdo M. Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1921-31.
97. Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2002; 2: 15-20.
98. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 4968-76.
99. Carette JE, Overmeer RM, Schagen FH, Alemany R, Barski OA, Gerritsen WR, Van Beusechem VW. Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 2663-7.
100. Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 2003; 9: 1539-44.
101. Van den Haute C, Eggermont K, Nuttin B, Debyser Z, Baekelandt V. Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1799-807.
102. Kjaer SK, van den Brule AJC, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. Type specific persistence of high risk Human Papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002; 325: 1-7.

103. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 690-8.
104. Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* 2008; 13: 1003-17.
105. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10(4): 431-42.
106. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(4): 275-83.
107. Dick FA, Dyson NJ. Three regions of the pRb pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. *J Virol* 2002; 76: 6224-34.
108. Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 1996; 15: 1950-60.
109. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8211-16.
110. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a. *J Virol* 1996; 70: 10-16.
111. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J* 2002; 436: 722-8.
112. Phillips AC, Vousden KH. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. *J Gen Virol* 1997; 78: 905-9.
113. Maldonado E, Cabrejos ME, Banks L, Allende JE. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *J Cell Biochem* 2002; 85(4): 663-9.
114. Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1992; 66: 325-33.
115. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001; 75: 4283-96.
116. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González JM, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor beta-1 promoter throughout Sp1 regulatory element. *Viral Immunology* 2006; 19: 468-80.
117. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 1992; 66: 2125-34.
118. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89: 213-28.
119. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*. 2002; 21: 6041-8.
120. Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, et al. *In vitro* and *in vivo* Growth Suppression of Human Papillomavirus 16-Positive Cervical Cancer Cells by E6 siRNA. *Molecular Therapy* 2003; 8: 762-8.
121. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 5938-45.
122. Lea JS, Sunaga N, Sato M, Kalahasti G, Miller DS, Minna JD, Muller CY. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reprod Sci*. 2007; 14: 20-28.
123. Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6693-7.
124. Koivusalo R, Krausz E, Helenius H, Hietanen S. Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: Opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 372-82.
125. Putral LN, Bywater MJ, Gu W, Saunders NA, Gabrielli BG, Leggatt GR, McMillan NA. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1311-19.
126. Niu XY, Peng ZL, Duan WQ, Wang H, Wang P. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 743-51.
127. Jiang M, Rubbi CP, Milner J. Gel-based application of siRNA to human epithelial cancer cells induces RNAi-dependent apoptosis. *Oligonucleotides* 2004; 14: 239-48.
128. Takuma F, Miyuki S, Eri I, Takahiro O, Yoshifumi T, Shigenori H, et al. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncology* 2006; 29: 541-8.
129. Gu W, Putral L, McMillan N. siRNA and shRNA as anticancer agents in a cervical cancer model. *Methods Mol Biol* 2008; 442: 159-72.
130. Naldini L, Verma IM. Lentiviral vectors. *Adv Virus Res* 2000; 55: 599-609.
131. Wang R, Lin F, Wang X, Gao P, Dong K, Wei SH, et al. The therapeutic potential of survivin promoter-driven siRNA on suppressing tumor growth and enhancing radiosensitivity of human cervical carcinoma cells via downregulating hTERT gene expression. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(8): 1295-301.
132. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005; 9(2): 360-72.
133. Kuner R, Vogt M, Sultmann H, Bunes A, Dymalla S, Bulkescher J, et al. Identification of cellular targets for the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes by RNA interference and transcriptome analyses. *J Mol Med*. 2007; 85: 1253-62.
134. Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 124-9.
135. Yamato K, Yamada T, Kizaki M, Ui-Tei K, Natori Y, Fujino M, et al. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Therapy* 2008; 15: 140-53.
136. http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html.
137. Sima N, Wang W, Kong D, Deng D, Xu Q, Zhou J, et al. RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis* 2008; 13: 273-81.

Reimpresos:

Dr. Oscar Peralta-Zaragoza

Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer
 Instituto Nacional de Salud Pública.
 Av. Universidad 655,
 62508, Cuernavaca, Mor.
 Tel.: (+52)-777-3292886.
 Fax: (+52)-777-3175485
 Correo electrónico: operalta@correo.insp.mx

Recibido el 15 de julio de 2009.
 Aceptado el 14 de diciembre de 2009.