
ARTÍCULO DE REVISIÓN

RNA de interferencia y su potencial terapéutico en cáncer

Salvador Vázquez-Vega,* Adriana Contreras-Paredes,** Marcela Lizano-Soberón,**
Alfredo Amador-Molina,** Alejandro García-Carrancá,** Lilia Patricia Sánchez-Suárez,*** Luis Benítez-Bribiesca***

* Departamento de Anatomía Patológica. Hospital de Ginecopediatría 3 A. IMSS Delegación Norte.

** Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.

Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México.

*** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico SXXI IMSS.

RNA interference (RNAi) and its therapeutic potential in cancer

ABSTRACT

Small RNAs belong to a newly discovered strain of molecules. These molecules are composed of double strand RNA comprised by just about 19-31 nucleotides. They have two main characteristics that make them unique. Firstly, they are non-coding for proteins and second they interfere post-transcriptional with mRNA. This interfering action is the distinguishing hallmark, therefore known as interfering RNA or RNAi. There are three main subclasses of which microRNA and siRNA are the most widely studied. Interference RNAs participate in a myriad of cellular functions mainly through modulation of genetic expression. Due to these capabilities it has been used as therapeutic weapon in a number of diseases including cancer. It is known that both miRNA and siRNA participate in carcinogenesis, either inhibiting suppressor genes, or stimulating oncogenes. It has been demonstrated that manipulating small interfering RNAs in cell lines and animal models, the malignant and metastatic phenotype can be reversed. Up to now a few clinical trials using RNAi as a therapeutic agent have demonstrated some success and feasibility. It is foreseeable that in the near future cancer treatment with small RNAs will be widely applicable, once the many constraints for its systemic application are surpassed.

Key words. Interference RNA. siRNA. miRNA. Cancer.

RESUMEN

Los RNAs pequeños pertenecen a una estirpe de moléculas recientemente descubiertas. Estas moléculas están compuestas de RNA de doble cadena de 19 a 31 nucleótidos. Tienen dos características principales que las hacen únicas. La primera es que no codifican para proteínas y la segunda es que su acción de interferencia ocurre postranscripcionalmente con el RNAm (RNA mensajero). Dicha acción de interferencia es el sello que las distingue y por ello se les conoce como RNA de interferencia o RNAi. De manera general hay tres subclases, de las cuales los miRNA y los siRNA han sido las más estudiadas. Los RNA de interferencia participan en una miríada de funciones celulares principalmente a través de la modulación de la expresión de los genes. Debido a estas capacidades se ha pensado en utilizarlos como armas terapéuticas en un número de enfermedades incluyendo al cáncer. Se sabe que tanto los miRNA como los siRNA participan en la carcinogénesis ya sea inhibiendo genes supresores o estimulando oncogenes. También se ha demostrado que la manipulación de los RNAi en líneas celulares y modelos animales, pueden revertir el fenotipo maligno y metastásico. A la fecha son pocas las pruebas clínicas en las que se emplean a los RNAi como agentes terapéuticos, algunas de ellas han tenido resultados exitosos y viables. Es previsible que en un futuro cercano el tratamiento del cáncer con RNAs pequeños tenga una amplia aplicación, una vez que muchos de los obstáculos para su aplicación sistemática sean sobrepassados.

Palabras clave. RNA de interferencia. siRNA. miRNA. Cáncer.

INTRODUCCIÓN

Hace alrededor de 10 años se descubrió una nueva estirpe de ácidos ribonucleicos con estructura y fun-

ción peculiares. Se trata de moléculas de RNA de doble cadena con apenas unos 19-31 nucleótidos. Por su tamaño se les denominó RNAs pequeños.¹ Esta nueva familia de RNAs tiene en esencia dos caracte-

rísticas; la primera es que son no codificantes para proteínas y la segunda es interferir postranscripcionalmente con el RNAm complementario. Por ello se les conoce genéricamente como RNA de interferencia (RNAi).² Los RNAi pueden clasificarse en tres clases principales con base en su origen o los componentes a los cuales se acoplan. La primera clase corresponde a los micro-RNAs o miRNAs, cuyo tamaño va de 19 a 25 nucleótidos; los segundos, son los RNAs pequeños de interferencia o siRNAs, con un tamaño que va de 19 a 21 nucleótidos, ambos son generados a partir de un precursor (RNA largo de doble cadena), el cual es cortado por Dicer, que es una enzima ribonucleasa III. Finalmente la tercera clase está formada por RNAs asociados a la proteína Piwi (piRNAs), éstos son de mayor tamaño (26 a 31 nucleótidos) y se generan de forma independiente de Dicer.¹ Tal parece que estas moléculas filogenéticamente conservadas surgieron evolutivamente como defensa contra la invasión de virus.³⁻⁵

El interés acerca de su capacidad para inhibir y modular la expresión génica se inició a partir del trabajo de Fire A. y Mello C. en 1998⁶ en *C. elegans*, así como por su identificación a partir del 2001 en células de diferentes mamíferos.^{7,8} Esa propiedad inhibitoria se debe a que los RNA pequeños de doble cadena llevan a cabo una eficiente degradación de secuencias análogas al RNAm complementario, mecanismo denominado RNA de interferencia (RNAi).⁹

Los RNAi participan en procesos como: control de los transposones, remodelación de la cromatina, inhibición de la traducción e inhibición y degradación del RNAm específico de un gen.¹⁰ Es a través de estas funciones que forman parte de los complejos mecanismos de regulación génica, tanto en procesos normales, como la embriogénesis, la proliferación celular y la apoptosis, así como en un sin número de patologías, como el cáncer.¹¹ Es por ello que el uso de los RNAi como herramienta terapéutica se está investigando en varias enfermedades, pero particularmente en el terreno oncológico donde ya se han iniciado estudios clínicos.^{12,13}

En este trabajo se resume el papel de los RNAi en la patogénesis del cáncer y se analiza su uso potencial para el diagnóstico y tratamiento oncológico.

LOS miRNAs (MICRO-RNAs)

Los miRNA (micro-RNAs) poseen un papel muy importante en la regulación de la expresión génica en animales,¹³ plantas,¹⁴ y virus,¹⁵ ya que reprimen postranscripcionalmente la expresión de genes que codifican para proteínas, mediante la degradación

directa de su RNAm o evitando su traducción por un apareamiento complementario imperfecto de los miRNAs al RNAm blanco (este mecanismo no ha sido claramente dilucidado).^{11,16,17}

Los genes regulados por los miRNAs, codifican para proteínas que participan en numerosos procesos biológicos como es el desarrollo embrionario, la división celular, la apoptosis y en algunas enfermedades como el cáncer.^{2,11}

En un inicio Ambros, et al. determinaron la existencia de una secuencia pequeña de RNA en *C. elegans*, complementaria al gen lin-14, implicado en el control del desarrollo larvario,¹⁸ a este miRNA se le llamó lin-4 (lineage-deficient-4). Posteriormente se identificaron cientos de miRNAs en *C. elegans* y en otros animales.¹⁹⁻²² Al 2009 se han caracterizado 174 miRNAs en *C. elegans*, 157 en *Drosophila melanogaster* y aproximadamente 721 en el humano. Actualmente el número de miRNAs en 58 especies es 10,883.²³⁻²⁶ Es evidente que su número ha aumentado significativamente y por estudios bioinformáticos se predice la existencia de aproximadamente 1,000 miRNAs en el humano,²⁵ aun cuando el conocimiento de su función está limitado a 200-300.²⁷

EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS miRNAs EN CÁNCER

El cáncer se caracteriza por un aumento descontrolado de la proliferación e inhibición de la apoptosis celular. Varias investigaciones sugieren que los miRNAs regulan el funcionamiento de oncogenes o genes supresores de tumor, que codifican para proteínas implicadas en el control del crecimiento celular y la apoptosis.^{28,29}

La evidencia inicial de la participación de los miRNAs en cáncer se observó en la leucemia linfocítica crónica, ya que en más de la mitad de los pacientes con este tipo de cáncer se deleta una pequeña región del cromosoma 13q14, la cual codifica para dos transcritos que corresponden a los miR-15 y miR-16, cuya expresión se abate en un alto porcentaje de los pacientes con este tipo de leucemias.³⁰

Varios estudios muestran que los miRNAs se expresan de forma anormal en diferentes tipos de cánceres humanos (Cuadro 1).³¹ Además, se ha determinado que más de 50% de los genes que transcriben para estos RNAs, se localizan en sitios de inestabilidad genómica asociados al desarrollo de cáncer (Cuadro 2).³² Sin embargo, estos datos representan sólo el inicio del estudio del papel de los miRNAs en cáncer. Además sólo en pocos casos ha sido posible correlacionar los estudios experimenta-

Cuadro 1. Expresión anormal de miRNAs en diferentes tipos de cáncer.

Órgano	Tipo de enfermedad	miRNAs Sobre-expresados	miRNAs Sub-expresados
Hígado	HCA, FNH* HCC*†	224, 21, 224, 10b, 221, 222, 20, 18	122a, 422b, 203, 200c, 199a, 199b, 200b, 223, 122 214, 145, 150
Páncreas	Colangiocarcinomas* PET* Insulinomas* PACC* Adenocarcinoma ductal*†	21, 23a, 141, 200b, 27a, 23a, 342, 26a, 30d, 26b, 103, 107 203, 204, 211, 23a, 342, 26a, 30d, 26b, 103, 105 21, 221, 181a, 155, 222, 181b, 107	155, 326, 339, 326 155, 326, 339, 326 148a, 375
Esófago	ESCC*	25, 424, 151	140, 205, 203, 202, 100, 99, 29c
Estómago	Adenocarcinomas*†	21, 223, 25, 17-5p, 125b, 181b, 106 ^a , 107, 92, 103, 221, 93, 100, 106b	136, 218, 212, 96, 339
Colon	Adenomas* Adenocarcinomas*† Adenocarcinoma etapa II*	21 21, 92, 20a, 106a, 92, 223, 203	145
Tejido hematopoyético	CLL*	190, 33, 19a, 140, 123, 10b, 92, 188, 154, 217, 101, 196, 134, 141, 132, 192, 16, 15	181b, 220
Ovario	Carcinomas seroso, de; * células claras, endometrio	200a, 200c	Let-7d, 100, 101, 105, 125a, 125b, 126, 133a, 137, 140, 143, 147, 199a, 199b, 224, 9, 9*, 99a
Mama	Carcinomas*	155, 21	125b, 145, 10b
Pulmón Glándula pituitaria	NSCLC† Adenoma*	21, 191, 155, 210 15, 16	126*, 224
Próstata	Carcinomas†	32, 182, 31, 26a, 200c	520h, 494, 490, 133a, 1, 218, 220, 128a
Tiroides	Carcinomas papilares* Carcinomas anaplásicos	221, 221, 146a, 181b	30d, 125b, 26a, 30a-5p

HCA: Carcinomas hepatocelular. FNH: Hiperplasia focal nodular. PET: Tumor endocrino pancreático. PACC: Carcinoma pancreático de células acinares. ESCC: carcinoma epidermoide de esófago. CLL: Leucemia linfocítica crónica. NSCLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas. *miRNA análisis comparativo: tejido normal vs. tejido tumoral. †miRNA análisis comparativo: tejido normal vs. tejido tumoral. (Tomado de Visone R, 2009).

les en humanos.³¹ Por lo que uno de los retos en la actualidad sería correlacionar la expresión de los miRNAs en las diversas neoplasias, así como encontrar su papel como biomarcadores, así como su valor terapéutico en el cáncer.

Para el estudio de estas multifuncionales moléculas ha sido necesario emplear diferentes estrategias; como es la generación de mutaciones puntuales de

los miRNAs y/o en sus genes blanco,^{33,34} la utilización de sondas anti sentido para bloquear la función de estos RNAs tanto *in vitro* como *in vivo*,³⁵ así como, el desarrollo de microarreglos específicos para conocer el perfil de expresión de los miRNAs.²⁷ Estos estudios también han permitido determinar que los miRNAs poseen una función dual, es decir, por un lado los denominados “oncomirs” promueven el

Cuadro 2. Localización cromosómica de los miRNAs y su asociación en diferentes tipos de cáncer.

miRNA	Localización del Gen	Asociación con Cáncer	Función
miR-15a, miR-16-1	Cromosoma 13q14	Frecuentemente deletado o desregulado en Leucemia linfocítica crónica de células B. Regula negativamente el gen anti-apoptótico BCL-2	ST
miR-143 miR-145	Cromosoma 5q32-33	Disminuido en Cáncer colo-rectal; desregulado en cáncer de mama, próstata, de cérvix y líneas celulares de cáncer linfóide; miR-145 está disminuido en cáncer de mama	ST
miR-21	Cromosoma 17q23.2	Factores anti-apoptóticos; sobre-regulados en glioblastomas y cáncer mama.	OG
Miembros de la familia let-7	Localización Múltiple	Regula negativamente a oncogenes Ras; proliferación celular y diferenciación; se encuentra disminuido en cáncer de pulmón	ST
miR-142	Cromosoma 17q22	Translocación en los lugares (8;17) del oncogén MYC río abajo de la estructura de tallo y asa miR-142 resultando en una agresiva leucemia de células B que es debida a la sobre expresión de MYC	N/A
BIC/ miR-155	Cromosoma 21q21	Sobre-regulado en linfomas de Burkitt, Hodgkin y linfoma mediastínico primario y difuso de células B largas. Sobre-regulado en cáncer de mama	OG
Grupos miR-17-19b	Cromosoma 13q31-32	Sobre-regulados por MYC; modula negativamente los oncogenes E2F; pérdida de heterocigocidad, este grupo se encuentra en carcinoma hepatocelular. Sobre-expresado en linfomas de células B.	ST/OG

N/A: No aplicable. OG: Oncogene. ST: Supresor de tumor. (Tomado de Esquela-Kerscher A, 2006).

desarrollo de diversas neoplasias al regular negativamente a genes supresores de tumores, pero por otro lado, algunos miRNAs inhiben la acción de oncogenes, por lo que podrían ser considerados como genes supresores de tumor.³⁶

En algunos cánceres ha sido posible correlacionar la expresión de los miRNA con aspectos clínico-patológicos. Uno de los casos es en la leucemia linfocítica crónica, en la que se ha determinado que los miRNAs: miR-15 y miR-16, disminuyen su expresión en un alto porcentaje de pacientes con esta neoplasia y esto correlaciona con aspectos clínicos como respuesta al tratamiento y tiempo de sobrevida.³⁰ También se ha determinado que los miRNAs regulan negativamente al gen BCL-2, ya que la expresión de este gen es inversamente proporcional a la de los miR-15a y miR-16-1, tanto en muestras de pacientes, como en líneas celulares de leucemia.³⁷ Estos hallazgos sugieren la posible utilización de estos miRNAs como una herramienta terapéutica en la leucemia linfocítica crónica y quizás en otros tipos de cáncer, donde se sobreexpresa la proteína Bcl-2. Otro miRNA que ha demostrado su desregulación en cáncer, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, es el

miRNA let-7, que está implicado en el desarrollo del cáncer de pulmón. Los niveles de expresión de este miRNA, están significativamente reducidos en tejido neoplásico de pacientes con este tipo de cáncer, que se correlaciona directamente con un corto periodo de sobrevida, independientemente del estadio de la enfermedad. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de let-7 en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón, abate la proliferación celular mediante la inhibición de la expresión de genes como Ras y c-Myc.^{38,39}

También se ha demostrado que la disminución de la expresión del miRNA let-7 en tejido neoplásico, induce un aumento en los niveles de la proteína Ras. Estos resultados indican, por lo tanto que la vía de señalización de Ras es importante en la patogénesis del cáncer de pulmón y que el empleo del miRNA let-7, podría utilizarse como agente terapéutico en esta neoplasia.³⁹

Por medio de microarreglos se han identificado perfiles de expresión diferencial de los miRNAs, en tejidos neoplásicos y tejido normal.⁴⁰ Sin embargo, no se ha podido identificar si estos cambios se presentan como resultado del establecimiento de la neo-

plasia o como iniciadoras de ésta, debido a que no se ha podido definir la función específica de la mayoría de los miRNAs.²⁷

EL EMPLEO DE miRNAs COMO POSIBLES AGENTES TERAPÉUTICOS

Se han realizado diversos estudios en la aplicación de los miRNAs como agentes terapéuticos, tal es el caso de la utilización de miRNA sintéticos que transfecados mediante liposomas en diversas líneas celulares, han permitido obtener información del funcionamiento de diferentes genes en el establecimiento del cáncer.⁴¹

Uno de los más recientes estudios con miR-26a, demostró un efecto antiproliferativo inducido en la línea celular HepG2 de humano. Además, en ratones con cáncer hepático introduciendo secuencias de este miRNA, se demostró que en 80% de los casos desapareció el tumor, mientras que sólo en 20% de ellos el tumor se redujo de tamaño. Es importante destacar que no se observaron efectos tóxicos del miR-26a en estos modelos y se comprobó su acción para bloquear la proliferación.⁴² Por lo que es posible pensar que el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer hepático mediante la re-expresión del miR-26a puede tener aplicación clínica.

Estos antecedentes ofrecen evidencias y sugieren la utilización de los miRNAs como herramienta terapéutica para diversas neoplasias. Sin embargo, para que los miRNAs puedan emplearse con propósitos clínicos, es necesario dilucidar claramente su función y sus mecanismos de acción tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto permitirá en un futuro cercano el desarrollo potencial de estrategias terapéuticas.

LOS RNA PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA O siRNAs

El siRNA o “RNA de silenciamiento” es un tipo de RNAi de doble cadena, que a diferencia de los miRNAs, es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su RNAm blanco.⁴³ En células normales, los siRNAs actúan en procesos como son la defensa antiviral y la organización y/o metilación de la cromatina.¹¹

LOS siRNAs EN LA IDENTIFICACIÓN DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA CARCINOGENESIS

Los siRNA pueden ser útiles para identificar un sin número de genes que participan en distintas vías

celulares, lo que es de particular importancia en el estudio de enfermedades, como el cáncer.^{43,44}

Mediante el empleo de los siRNAs ha sido posible identificar genes de susceptibilidad al cáncer que participan en diferentes etapas de la génesis del tumor.^{44,45} Por ejemplo, en la regulación de la proliferación celular los receptores del tipo PTK para factores de crecimiento, son reguladores en la transducción de señales intracelulares, que cuando se encuentran mutados o alterados estructuralmente, se tornan potentes oncoproteínas que participan en la transformación celular. Dicha transformación puede ocurrir como resultado de rearreglos genómicos, como en el caso de Bcr/Abl observado en leucemia mieloide crónica. La introducción de siRNA es capaz de disminuir la expresión de la proteína quimérica e inducir apoptosis celular y sensibilizar las células a la quimioterapia.⁴⁶

El descontrol en la proliferación celular puede también resultar de la ganancia de función. Por ejemplo, en cáncer de pulmón de células no pequeñas las mutaciones dentro del dominio catalítico de la cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR), puede llevárselo a una expresión constitutiva, que se refleja en la activación de la proliferación y sobrevivencia celular. La inactivación de estos mutantes *in vitro* mediante siRNA resulta en una apoptosis celular masiva.^{47,48}

También puede ocurrir la amplificación génica, un ejemplo es la activación constitutiva de la vía de Neu/ErbB2 amplificado en carcinoma de ovario y mama. En estos casos el silenciamiento por siRNA y abatimiento de la expresión de la proteína Her-2/neu en líneas celulares de ovario y mama, inhibió la proliferación celular y favoreció la apoptosis, efecto que se ha correlacionado con el incremento en la expresión del factor antiangiogénico trombospondina 1, así como la disminución en la expresión del factor del crecimiento endotelial vascular, que es proangiogénico.⁴⁹

De las moléculas que participan en la regulación del ciclo celular, dos son de especial importancia en cáncer; Rb y p53. Para el caso de Rb, las alteraciones en genes que participan en esta vía resultan en la pérdida de la senescencia y apoptosis celular en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo en cáncer cervicouterino con infección del virus del papiloma humano (VPH) la proteína oncoprotéica E7, que se expresa constitutivamente en líneas celulares derivadas de este tipo de cáncer infectadas con VPH-16 y/o 18, representa un blanco de estudio en la vía de Rb. La oncoproteína E7 inactiva a Rb contribuyendo a la transformación celular, el silenciamiento de la expresión de esta oncoproteína mediante siRNA se

refleja en la inducción de la muerte celular por apoptosis.^{50,51}

La vía de p53 está compuesta de genes y productos génicos que responden a un sinnúmero de señales intrínsecas y extrínsecas con efecto en procesos de reparación del DNA, segregación de cromosomas y división celular. Esta proteína en aproximadamente 50% de los cánceres humanos no es funcional y diversas moléculas que participan en la vía de p53 han sido estudiadas mediante la tecnología del siRNA, determinándose que varias de ellas como; Hdmx, Notch-1, Delta-like-1 o Jagged-1 tienen potencial como blancos terapéuticos al favorecer la apoptosis celular.^{52,53} Otro ejemplo de la utilización de los siRNA en el silenciamiento de genes virales que favorecen la transformación maligna, es la inhibición de la expresión de E6 del VPH-16 y/o 18 en líneas celulares. Se sabe que E6 promueve la degradación de p53 y el silenciamiento en la expresión de E6 en estas células provoca la muerte celular masiva por apoptosis.^{54,55}

Los esquemas de quimio y radioterapia tienen como actividad central, inducir apoptosis en las células transformadas. Por otro lado, la expresión de proteínas antiapoptóticas participan en la quimio y radio resistencia de estas células, por lo que la restauración de la apoptosis empleando siRNAs contra los genes que codifican para proteínas antiapoptóticas podría tener implicaciones terapéuticas importantes, en esta categoría se incluye a las proteínas FLIP, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, survivinas y las XIAP.⁵³

También se han estudiado blancos moleculares relacionados con senescencia en células neoplásicas, proponiéndose que siRNAs dirigidos contra la fracción hTER de la telomerasa puede causar inhibición de la proliferación celular y apoptosis independiente de p53.⁵⁶

De los blancos moleculares que participan en angiogénesis, invasión/metástasis y evasión del sistema inmune, que pueden ser útiles para el desarrollo de estrategias terapéuticas, el VEGF es promisorio, ya que juega un papel importante en la angiogénesis patológica en varios cánceres. Su inhibición, tanto en líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 como en modelos murinos, suprime tanto la angiogénesis, así como el crecimiento neoplásico.⁵⁷ En relación con la invasión y metástasis se ha visto que la sobreexpresión de RhoA en cáncer gástrico favorece la transformación y motilidad celular, su inhibición por siRNA inhibe la proliferación y favorece la quimio sensibilidad a adriamicina y 5-fluoracilo.⁵⁸ Otro ejemplo es el receptor 4 de la quimiocina CXC (CXCR4) importante en la metástasis de cáncer de mama. El abatimiento de la expresión de CXCR4 me-

diante el empleo de siRNA en la línea celular MCF-7 y en modelos murinos, inhibió significativamente la capacidad de migración de estas células.^{59,60} Actualmente se discute su posible utilidad clínica como marcadores predictivos y terapéuticos en cánceres con metástasis.⁶¹

Se han sugerido varios mecanismos de evasión del sistema inmune de las neoplasias. Uno de dichos mecanismos está mediado por el factor de crecimiento transformante-β y se ha visto que la inhibición de la expresión de dicho factor mediado por siRNAs evita la evasión de la neoplasia a la acción de la respuesta inmune por parte de las células T.⁶² Otro importante inmunosupresor es la interleucina-10 (IL-10), que también interfiere con la función de las células T, el silenciamiento en la expresión de esta citocina por siRNAs induce apoptosis.⁶³

Cuadro 3. Genes blancos para el desarrollo de terapias potenciales en cáncer mediante siRNAs.

Etapa de carcinogénesis	Gen	Modelo
Estabilidad genómica	RAD 51	Oocito
	ERCC1	COS-7
	ERCC2	S2 de <i>Drosophila</i>
	ATR	NBS1 y FA
Iniciación y progresión de la neoplasia	K-RAS	CAPAN-1
	EGFR	A431
	C-MYC	COS-1
	HBV mRNA	HuH-7
	E6	SiHa
	E7	HeLa
	Rb	SL2
	P53	SiHa, HeLa, CaSki
	INK4A	MCF-7, HeLa
Invasión y metástasis	Mdm-2	MCF-7,HCT116
	CXCR4	MCF-7,MDA-BA 231
	FOS	HCT116
	MMP-9	SNB19
Angiogénesis	EPHA2	PANC1
	RECK	CL-1
Apoptosis	Tie-2	Células endoteliales humanas
	Livin	HeLa, MeWo, H1299
Evasión inmune	Bcl-2, XIAP	MCF-7
	IL-6	Ratón IL-6 ^{-/-}
	PKB	HEP3B

(Tomado y modificado de Tan F.L., et al. 2005, Putral L.N. 2005, Kuner R., et al. 2007).

La expresión de genes de resistencia a fármacos (MDR) representa un mecanismo importante por el cual las células neoplásicas son refractarias a la quimioterapia. El empleo de siRNAs para silenciar la expresión de varios de ellos, como ABCB1 (MDR1), ABCB4 (MDR3) y ABCB5 en líneas celulares, ha demostrado que puede sensibilizar a las células a la quimioterapia.⁶⁴⁻⁶⁶

Otra posibilidad para inhibir la quimio y radio resistencia, consiste en silenciar los genes implicados en procesos de reparación del DNA, como, por ejemplo: el producto del gen ERCC1 y del gen ATM. En líneas celulares, el silenciamiento de estos genes mediado por siRNAs suprime la reparación del DNA y promueve la sensibilización de las células transformadas.^{67,68}

En el cuadro 3 se muestran algunos de los genes blancos para el desarrollo de terapias contra el cáncer. En conclusión, los genes identificados mediante el empleo de siRNAs, que participan en diferentes eventos de la carcinogénesis, representan blancos potenciales para el desarrollo de terapias oncológicas, que podrían ser utilizadas en combinación con esquemas convencionales de quimio o radioterapia.

APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS siRNA

El RNAi se ha vuelto una importante herramienta genética y quizás sea la estrategia terapéutica

más promisoria para un amplio espectro de patologías humanas, a pesar de sus limitaciones y retos a vencer.² Numerosos estudios han documentado la eficacia del RNAi *in vitro* en animales de laboratorio y estudios clínicos, que sugieren que el empleo del RNAi en humanos es seguro. Los resultados de Fase I de los dos primeros tratamientos para la degeneración macular (AMD) demuestran que los siRNA son bien tolerados y tienen propiedades farmacocinéticas adecuadas.⁶⁹ En un estudio del 2007,⁷⁰ lograron una expresión estable hasta por 14 meses de siRNAs dirigidos contra el receptor de la quimiocina (CCR5) introducidos en células hematopoyéticas CD34+ transplantadas. De Vicenzo, *et al.* reportaron que la administración intranasal del siRNA ALN-RSV01 dirigido contra el RNAm que codifica para la proteína N del virus sincicial respiratorio (RSV) fue tolerado y sus efectos adversos fueron semejantes al placebo.⁷¹ Fetz V, *et al.* han reportado que en tumores de cabeza y cuello, la actividad de los siRNA *in vivo* dirigidos contra survivinas, promueve la muerte de células malignas resistentes a fármacos.⁷² Por otro lado, Matzukura, *et al.* mostraron que la inyección intravenosa de siRNA o de plásmidos que expresan secuencias procesadas para siRNA, pueden inhibir la acción del virus de la hepatitis.⁷³ Estas evidencias muestran que el RNAi tiene un enorme potencial para el desarrollo de terapias dirigidas contra blancos específicos (Cuadro 4).⁴⁵

Cuadro 4. Desarrollo de terapias oncológicas y otras enfermedades basadas en RNA de interferencia (siRNA).

Enfermedad	Etapa	Tipo de RNAi	Presentación	Compañía/Institución
Enfermedades Oculares				
AMD	Etapa Pre-Clínica	siRNA	Inyección	Quark Biotech
	Prueba Clínica fase I	siRNA	Intra-vitreal	Sirna Acuity
	Prueba Clínica fase II	siRNA		
Infecciones virales				
Hepatitis B y C	Etapa Pre-Clínica	shRNA	Ligandos de nanopartículas	Nucleonics/ Intradigm
RSV	Prueba Clínica fase I	shRNA	Aerosol	Alnylam
HIV	Prueba Clínica fase I	shRNA	Lentivirus	Benitec/City of Hope
Cáncer				
Cáncer hepático	Etapa Pre-Clínica	siRNA	Ligandos de nanopartículas	Calando
Tumores sólidos	Etapa Pre-Clínica	siRNA	Ligandos de nanopartículas	Intradigm
Otro Tipo de Enfermedades				
ALS	Etapa Pre-Clínica	siRNA	N/A	CytRx
Enfermedades Inflamatorias	Etapa Pre-Clínica	siRNA	Péptidos	Nastech

ALS: Esclerosis lateral amiotrópica; AMD: Degeneración macular relacionada con la edad. RNAi: RNA de interferencia. RSV: Virus sincicial respiratorio. shRNA: RNA de pequeñas horquillas. siRNA: RNA pequeños de interferencia. (Tomado de Kim DH, *et al.* 2007).

PROBLEMAS TÉCNICOS EN LA APLICACIÓN TERAPÉUTICA

Las terapias basadas en RNAi no son inmunes a los retos técnicos y la eficacia para la introducción de éstos desempeña un papel preponderante en cualquier aplicación de terapia génica en mamíferos. El desarrollo de mejores formas de introducción de RNAi dará una ventaja única a este tipo de terapia, ya que favorecerá el silenciamiento de genes de manera sistémica célula a célula, como se ha observado ya en animales inferiores.^{37,53}

El uso de siRNAs permite el silenciamiento génico (knock-down) específico de genes sin inducción de la respuesta de interferón inespecífica en células. La transfección de siRNAs de la longitud indicada en células puede burlar la respuesta de interferón y tomar como blanco RNAm específicos para su eliminación de manera eficiente. No obstante, este efecto es transitorio debido a que el siRNA transfectado se pierde por la degradación de nucleasas o bien porque se diluye como efecto de la división celular. Para solucionar esta limitación se han diseñado vectores plasmídicos codificantes de RNAs horquilla (shRNAs, short hairpin RNAs) con estructuras similares a las de las moléculas de siRNA activas. La producción continua de estos transcritos permite el silenciamiento de genes por siRNA de manera duradera.⁷⁴

Es importante destacar que varias de las tecnologías novedosas mediadas por plásmidos o vectores virales requieren del mejoramiento de reactivos que favorezcan la eficacia y especificidad de los tejidos para la introducción de RNA o DNA.^{13,36,53} Por ejemplo, para este fin, se sabe que el anestésico bupivacaína, cuando es mezclado con DNA y lípidos catiónicos puede eficientemente introducir plásmidos de DNA a los tejidos del cuerpo de mamíferos.⁷⁵ Desafortunadamente, en la mayoría de las investigaciones, la barrera hemato-encefálica al parecer permanece refractaria a la introducción de RNAi.² En este sentido se espera que la simple inoculación de RNA dúplex o de un vector que exprese RNA dúplex pueda proporcionar un efecto sistémico en el silenciamiento de genes a largo plazo. Además en muchos laboratorios se desarrollan investigaciones dirigidas a una transferencia sistémica para el silenciamiento en la transcripción de genes. Estos protocolos consideran la introducción de los RNAi a células blanco, longitud de estas moléculas, aumento de su vida media y distribución dentro de los tejidos.^{36,53}

Se han considerado otras opciones para lograr la expresión sistémica de los RNAi, tal es el caso de la utilización de blancos moleculares superficiales

que pueden ser accesibles vía inyección intravenosa o por la aplicación tópica de reactivos con RNAi.¹⁰ Aunque hasta la fecha, los resultados obtenidos en estos protocolos pueden ser considerados preliminares en humanos, proporcionan una fuerte justificación para el desarrollo de protocolos innovadores, enfocados a solucionar las limitantes técnicas de los RNAi en el tratamiento de enfermedades.

PERSPECTIVAS

El empleo de los siRNAs y los miRNAs, como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas oncológicas, ha despertado un gran interés en fechas recientes debido a que prometen ser más específicas y tener menos efectos secundarios.

Los resultados obtenidos de numerosas investigaciones demuestran la importancia del desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas basadas en RNAi, que ayuden a superar problemáticas, como es la resistencia de las neoplasias a los métodos tradicionales. Además se ha propuesto que estos RNAi pueden ser útiles como biomarcadores auxiliares en el diagnóstico y en la elaboración del pronóstico oncológico. Estos, también pueden ofrecer la posibilidad de reclasificar histológicamente a las neoplasias, lo que representaría la oportunidad de elegir los esquemas de tratamiento más adecuados.

La investigación en este campo de la genómica continúa proporcionando información novedosa y promisoria en relación a su biogénesis, mecanismos de acción, función y efecto biológico de los RNAi en condiciones normales o patológicas. Sin embargo, uno de los mayores retos a los que nos enfrentamos es el de encontrar los medios técnicos óptimos para introducirlos en las células blanco. La superación de estas dificultades técnicas permitirá la aplicación generalizada y exitosa de estos promisorios esquemas terapéuticos. Por lo que es previsible que en un futuro cercano el tratamiento del cáncer con RNAs pequeños tenga una amplia aplicación clínica.

REFERENCIAS

1. Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007; 213: 412-19.
2. Dragomira N, Draga T. RNA interference-Regulation and application in Oncology. *J Cancer Mol* 2008; 4: 67-77.
3. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431: 356-63.
4. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005; 19: 517-29.
5. Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Salcedo M. Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA. *Rev Invest Clín* 2006; 58: 335-49.

6. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.
7. 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.
8. Caplen N, Parrish S, Imani F, Morgan R. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9742-7.
9. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-8.
10. Zhang B, Pan X, Cobb G, Anderson T. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.
11. Winter J, Stephanie Jung, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009; 11: 228-34.
12. Tili E, Michaille JJ, Gandhi V, Plunkett W, Sampath D, Calin GA. miRNAs and their potential for use against cancer and other diseases. *Future Oncol* 2007; 3: 521-37.
13. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009; 136: 23: 215-33.
14. Floyd SK, Bowman JL. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* 2004; 428: 485-6.
15. Cullen BR. Viruses and microRNAs. *Nat Genet* 2006; 38(Suppl.): S25-S30.
16. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005; 123: 1133-46.
17. Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Chen J. Evidence for a preferential targeting of 3'-UTRs by cis-encoded natural antisense transcripts. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5533-43.
18. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75: 843-54.
19. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 797-9.
20. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 797-9.
21. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.
22. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-9.
23. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140-D144.
24. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D154-D158.
25. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120: 21-4.
26. <http://microrna.sanger.ac.uk/>.
27. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4: 199-227.
28. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-06.
29. Cheng A, Byrom M, Shelton J, Ford L. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1290-7.
30. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.
31. Visone R, Croce CM. MiRNAs and Cancer. *Am J Pathol* 2009; 174: 1131-8.
32. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.
33. Hutvágher G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2004; 2(4): E98.
34. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 2004; 10: 544-50.
35. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.
36. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10: 704-14.
37. Cimmino A, Calin GA, Fabbrini M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-9.
38. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-6.
39. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-47.
40. Lu J. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.
41. Tong AW. Small RNAs and non-small cell lung cancer. *Curr Mol Med* 2006 6: 339-49.
42. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model *Cell* 2009; 137: 1005-17.
43. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; 6: 464-77.
44. Tan FL, Yin JQ. Application of RNAi to cancer research and therapy. *Front Biosci* 2005; 10: 1946-60.
45. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics* 2007; 8: 173-84.
46. Wohlbold L, van der Kuip H, Miethling C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (ST1571). *Blood* 2003; 102: 2236-9.
47. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activates anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305: 1163-7.
48. Zhang M, Zhang X, Bai CX, Chen J, Wei MQ. Inhibition of epidermal growth factor receptor expression by RNA interference in A549 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 61-7.
49. Yang G, Cai KQ, Thompson-Lanza JA, Bast RC Jr, Liu J. Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 4339-45.
50. Kaelin WG Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999; 21: 950-8.
51. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* 2009; 392: 1-10.
52. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9: 701-13.

53. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6: 556-8.
54. Putral LN, Bywater MJ, Gu W, Saunders NA, Gabrielli BG, Le-ggatt GR, McMillan NA. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 1311-9.
55. Kuner R, Vogt M, Sultmann H, Buness 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.
56. Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 23709-17.
57. Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 2004; 64: 3365-70.
58. Liu N, Bi F, Pan Y, Sun L, Due Y, Shi Y, et al. Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6239-47.
59. Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Downregulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res* 2003; 63: 4801-04.
60. Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 967-71.
61. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, and Calin G A. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 293-302.
62. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001; 7: 1118-22.
63. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997; 71: 630-7.
64. Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1515-9.
65. Duan Z, Brakora KA, Seiden MV. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 833-8.
66. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2004; 64: 4294-301.
67. Chang IY, Kim MH, Kim HB, Lee DY, Kim SH, Kim HY, You HJ. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 225-33.
68. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res* 2003; 63: 1550-4.
69. Michels S, Schmidt-Erfurth U, Rosenfeld PJ. Promising new treatments for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 779-93.
70. An DS, Donahue RE, Kamata M, Poon B, Metzger M, Mao SH, et al. Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13110-5.
71. DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, Elbashir S, Harborth J, Toudjarska I, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* 2008; 77: 225-31.
72. Fetz V, Bier C, Habtemichael N, Schuon R, Schweitzer A, Kunkel M, et al. Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *Int J Cancer* 2009; 124: 2033-41.
73. Matsukura S, Jones PA, Takai D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e77.
74. Williams Bryan RG. Signal Integration via PKR. *Sci STKE* 2001; 89: re2.
75. Pachuk CJ, Ciccarelli RB, Samuel M, Bayer ME, Troutman RD, Zurawski DV, et al. Characterization of a new class of DNA delivery complexes formed by the local anesthetic bupivacaine. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1468: 20-30.

Reimpresos:

Dr. Luis Benítez-Bribiesca

Unidad de Investigación
Médica en Enfermedades Oncológicas,
Hospital de Oncología, Centro Médico SXXI IMSS.
Tel.: 5627-6900. ext.: 21982.
Correo electrónico: luisbenbri@mexis.com

Recibido el 17 de septiembre de 2009.
Aceptado el 16 de diciembre de 2009.