

Interferencia de RNA, una posible estrategia terapéutica en infecciones por Virus Sincitial Respiratorio

(RNA Interference, a Possible Therapeutic Strategy in Respiratory Syncytial Virus Infections)

Hilda Montero*
Everthlyn Mani**

Resumen

El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) es la principal causa de enfermedad respiratoria ocasionada por virus en la población pediátrica. A los dos años de edad, casi todos los niños habrán sido infectados con este virus. Nacimiento prematuro, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénica e inmunodeficiencia son factores de riesgo que predisponen una infección severa por VSR que requiere hospitalización, ventilación asistida mecánicamente o muerte. Actualmente no hay una vacuna contra VSR, sin embargo, existe un tratamiento profiláctico con un anticuerpo monoclonal llamado palivizumab. Esta revisión provee una breve descripción del RNA de interferencia como un posible tratamiento terapéutico en infecciones por VSR.

Abstract

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most important cause of viral respiratory tract illness in pediatric population. By 2 years of age, almost all children will have been infected with this virus. Premature birth, children with chronic lung disease, congenital heart disease and immunodeficiency are risk factors that predispose to severe RSV infection leading hospitalization, mechanically assisted ventilation or death. Nowadays, there is not RSV vaccine. However, there is a prophylaxis treatment with a monoclonal antibody named palivizumab. This review provides a brief description of the mechanisms of RNA interference used like possible treatment for RSV infections.

Palabras claves: virus sincitial respiratorio, interferencia de RNA.

Key words: respiratory syncytial virus, interferencia de RNA.

Introducción

Las enfermedades infecciosas representan un gran riesgo para la población. Dentro de estas enfermedades infecciosas, las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son la principal causa

de morbilidad y una de las primeras causas de mortalidad independientemente del género y la edad¹. El costo en consultas médicas, hospitalizaciones y tratamiento de estas enfermedades es alto, tanto para las familias como para los servicios de salud. Uno de los grandes retos para las instituciones de salud es su prevención y control. La mayoría de las veces, una infección respiratoria no presenta complicaciones. Sin embargo, existen grupos poblacionales como los niños, en que la infección con algunos patógenos llega a ser severa, e incluso fatal en caso de no recibir un tratamiento adecuado y oportuno^{1, 2}.

Los virus son los agentes etiológicos más frecuentes de las IRAs³. Existen aproximadamente 200 virus causantes de IRAs, los cuales se encuentran en diversas familias como *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Adenoviridae*, entre otras⁴. Todos estos virus entran por vía respiratoria y presentan un tropismo (especificidad por cierto tejido) por el aparato respiratorio ocasionando diversas enfermedades que, de manera general, se agrupan en IRAs de vías superiores o altas: rinitis, faringitis y laringitis; e IRAs de vías inferiores o bajas: bronquitis, bronquiolitis y neumonía⁵. A pesar de que el tropismo sea sobre el aparato respiratorio, algunos virus son diseminados en el organismo produciendo una enfermedad más generalizada (VSR⁶ y bocavirus⁷).

Gracias a diversos estudios epidemiológicos es posible tener información sobre la frecuencia de infección por virus respiratorios, así como, de su patogenicidad. Así, el virus influenza y el VSR son de especial interés para los responsables de la salud, al ser dos de los virus que más muertes han provocado y actualmente se consideran emergentes por el aumento de su incidencia⁸⁻¹⁰. Otros virus respiratorios reportados como virus frecuentes en la población infantil son: parainfluenza, rinovirus, adenovirus, coronavirus, y los recientemente identificados metapneumovirus y bocavirus^{3,11-14}. Estos virus generalmente ocasionan infecciones de vías respiratorias altas. En algunas ocasiones provocan complicaciones, por lo que se les considera de gran importancia clínica⁵.

* Investigador tiempo completo. Instituto de Salud Pública. Universidad Veracruzana. hmontero@uv.mx

** Estudiante de Biología. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana

VSR como agente causal de IRAs. Clasificación del virus

El VSR es un virus envuelto que pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y está clasificado dentro del género *Pneumovirus*. Su genoma es de RNA de cadena sencilla, no segmentado, polaridad negativa y dicho genoma codifica para un total de 11 proteínas^{15, 16}. Todas las proteínas virales tienen alguna función durante el ciclo replicativo. Desde el punto de vista inmunológico, la proteína G es la más importante por participar en la unión del virus a la célula huésped y representar la mayor parte antigénica del virus¹⁶. Con base en las características antigénicas, el VSR se clasifica en dos grupos denominados A y B¹⁷. Estos dos grupos presentan diferencia en su virulencia, siendo el tipo A el más virulento¹⁸.

Importancia clínica

El VSR tiene importancia en Salud Pública por ser el principal patógeno en enfermedades respiratorias en niños menores de cinco años^{2, 11, 12, 19}. Este virus es altamente infeccioso y la mayoría de los niños lo han contraído antes de los dos años de edad^{20, 21}. A pesar de que generalmente el VSR ocasiona infecciones respiratorias de vías altas, algunos niños desarrollan infecciones severas como la bronquiolitis²². En relación con esto, se ha encontrado que el VSR es responsable de hasta 80% de las bronquiolitis en infantes²³. En México, las IRAs tienen gran importancia como causa de morbilidad y mortalidad. Los niños de entre uno y cuatro años son los más afectados por este tipo de enfermedades, siendo la primera causa de mortalidad en este grupo de edad¹.

En los estados de México y San Luis Potosí se han realizados diversos estudios para determinar el patógeno causal de las IRAs en infantes, encontrándose que el VSR ocupa el primer lugar como agente etiológico de estas enfermedades^{3, 12, 24}. En países desarrollados como Estados Unidos se ha determinado que el VSR es responsable de 3% de las hospitalizaciones en niños menores de dos años que presentaban infecciones de vías respiratorias bajas. Sin embargo, en Europa la cifra es diferente, siendo el VSR responsable de 42 a 45% de las hospitalizaciones en el mismo grupo poblacional²⁵.

Es importante mencionar que la infección por VSR no se limita a la población pediátrica, este virus infecta a seres humanos en cualquier edad²⁶ y su diseminación aumenta por personas inmunocomprometidas, en quienes el virus alcanza su máxima replicación, provocando complicaciones en personas con VIH o cáncer y después de trasplantes de médula ósea²⁷⁻²⁹.

Manifestaciones clínicas

El VSR tiene un tropismo por las células del aparato respiratorio originando síntomas muy similares a los ocasionados por otros patógenos de vías

respiratorias como fiebre, rinorrea y congestión nasal. Cuando la infección avanza y el virus alcanza las vías respiratorias bajas ocasiona la bronquiolitis, en este momento, se presentan signos como sibilancias, apnea y cianosis requiriendo de hospitalización y de ventilación asistida mecánicamente^{20, 30, 31}.

Existen reportes que muestran que VSR o su genoma se encuentran en ojos, sangre, hígado, fluido cerebro espinal y miocardio, sugiriendo que este virus podría replicarse en otros órganos, a su vez implica que el cuadro clínico sería diferente, en caso de que esto sucediera en el paciente^{32, 33}. Además, la diseminación de este virus, severidad, prolongación o fatalidad de la infección están relacionados con la presencia de factores de riesgo como ser prematuro, padecer enfermedades pulmonares, cardiopatías, inmunosupresión, exposición a humo de cigarro, historia familiar de asma o atopía y bajo nivel socioeconómico³⁴⁻³⁸. El modo de transmisión de este virus se da a través del contacto directo con secreciones nasales y saliva proveniente de una persona enferma. No obstante, el VSR puede ser excretado en sudor y heces fecales³⁹, lo que constituye un extenso modo de transmisión ocasionando grandes epidemias y elevando la tasa de morbilidad y mortalidad si no se cuenta con medidas de control adecuadas.

La infección por VSR asociada al desarrollo de asma

Una de las características que distingue a este virus es que las infecciones son recurrentes y algunos grupos de investigación proponen que ocasiona infecciones persistentes^{19, 40, 41}. En relación con esto, diversos estudios muestran una asociación entre la infección a edad temprana con recurrentes infecciones y desarrollo de asma^{42, 19, 30}, la cual también es una enfermedad de importancia en Salud Pública. El asma es caracterizada por una obstrucción bronquial, inflamación e hiperrespuesta de las vías respiratorias³⁰. Esta enfermedad es muy frecuente estimándose que afecta a aproximadamente 155 millones de personas en todo el mundo, afectando la calidad de vida del enfermo y repercutiendo en la economía familiar³⁰. A pesar de la importancia de VSR como un agente que favorece el desarrollo de asma, en México no se han realizado estudios que nos permitan conocer la asociación del virus con esta enfermedad.

Tratamiento

A pesar del alto impacto de la infección por VSR durante la infancia, las opciones de tratamiento terapéutico e inmunoproláctico son limitadas.

Actualmente no existe alguna vacuna contra VSR debido a diversos problemas inherentes a su desarrollo, por ejemplo la edad en la que se presenta la severidad de la enfermedad y mortalidad es en menores de tres meses; a esta corta edad,

el recién nacido no respondería adecuadamente a la vacuna por la inmadurez inmunológica, además de originarse una respuesta por la presencia de anticuerpos maternos contra VSR^{43,44}.

Actualmente se cuenta con un tratamiento llamado palivizumab, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration)^{45,46}; es un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína viral de fusión (F) neutralizando al virus y evitando su infección, por lo que este anticuerpo es de uso inmunoproláctico⁴⁷. El uso de palivizumab ha mostrado una reducción en el número de hospitalizaciones ocasionadas por VSR³¹⁻⁴⁶. A pesar de la ventaja que ofrece su administración, existen desventajas como elevado costo y corto tiempo de protección (sólo protege por un mes)⁴⁵. Por lo anterior, su administración se recomienda sólo en grupos de alto riesgo y en la temporada de aumento de la prevalencia de VSR⁴⁵, pues las infecciones por este virus se presentan mayoritariamente por temporadas del año, invierno y primavera, aunque en algunas regiones de clima tropical se presentan durante el periodo de lluvias^{21,43,46}.

Interferencia de RNA

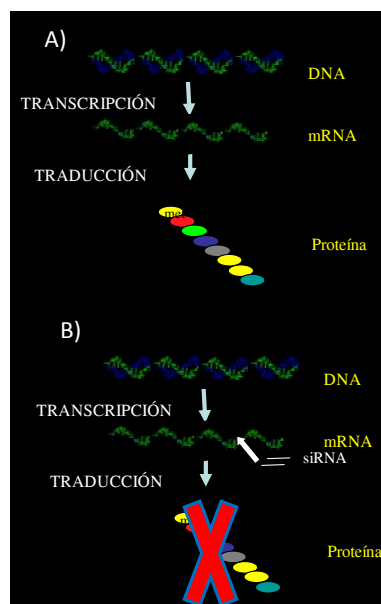
Uno de los descubrimientos más importantes en el campo de la Biología es el sistema de interferencia de RNA (RNAi), en el cual moléculas de RNA regulan la expresión de genes⁴⁸⁻⁵¹. De manera general, el proceso se basa en la acción de RNA de doble cadena (dcRNA) sobre el RNA mensajero (mRNA) blanco^{49,52}. Este mecanismo fue evidenciado en 1998 por Andrew Fire y colaboradores, quienes observaron que la introducción de moléculas de dcRNA en *Caenorhabditis elegans* produce una interferencia específica y potente contra el gene que posee una secuencia complementaria, fenómeno denominado RNAi⁵³. Actualmente, el sistema se ha denominado de diversas maneras según el organismo; en plantas se le conoce como silenciamiento genético post transcripcional, en hongos quelling y en animales RNAi. En estos organismos, el mecanismo es similar proponiendo que este sistema es antiguo y que estuvo presente en un ancestro común a dichos organismos⁵².

En células de mamífero, la presencia del dcRNA dentro de la célula favorece la activación de interferón⁵⁴. Sin embargo, si el dcRNA es menor a 30 pares de bases (pb), este sistema no es activado y el mecanismo de interferencia se lleva a cabo⁵⁵. Así, el intenso estudio del RNAi ha evidenciado que se lleva a cabo a través de diferentes RNAs pequeños, algunos de éstos se han denominado pequeños interferentes de RNA (siRNA). Los siRNAs son pequeños RNA de doble cadena de 21 pb con los extremos 5' fosfatados y un nucleótido sobresaliente en cada extremo 3'⁵⁵. El diseño de estas pequeñas moléculas se basa en buscar una secuencia que se una al mRNA blanco, así el silenciamiento del gene se da a un nivel post transcripcional, es decir, el mRNA sintetizado es unido al siRNA y consecuentemente

no se llevará el proceso de traducción (síntesis de la proteína) (figura 1)⁴⁹.

Los siRNAs han sido ampliamente usados para conocer la función de genes y actualmente han ganado importancia como una alternativa para el tratamiento de infecciones virales⁵⁶⁻⁵⁹. La estrategia se basa en que estas moléculas son utilizadas para inhibir la expresión de algún gene viral que participe en la replicación del virus y que, como consecuencia de su silenciamiento, se afecte negativamente a la replicación viral⁵¹. En este contexto, existe evidencia que en ratones infectados por VSR y tratados por vía intranasal con siRNAs (específicos a VSR), se ha logrado inhibir la replicación de este virus con la consecuente reversión de la enfermedad⁵⁹. Sin duda es una estrategia que ayudaría a curar muchas enfermedades de etiología viral, y en el caso específico de VSR, ofrece una alternativa terapéutica que evite muchas complicaciones fatales a un bajo costo.

Figura 1. Interferencia de RNA. A) Flujo de información genética y B) Flujo de información genética bloqueado a nivel post transcripcional por un siRNA con el consecuente silenciamiento genético.



Conclusiones

Para las instituciones de salud, un reto preponderante es disminuir la tasa de morbilidad y mortalidad, para lograrlo es importante iniciar conociendo las causas de éstas. En relación a las enfermedades infecciosas, es fundamental la identificación y el estudio biológico del agente causal de la enfermedad, estos conocimientos derivarán en el desarrollo de planes para tomar las medidas en el control adecuadas.

El VSR es un virus de gran importancia en Salud Pública y debe ser un blanco de control debido a los problemas asociados a su infección, sobre todo en niños menores de cinco años. A pesar de que existe un tratamiento inmunoproláctico contra la infección por VSR, en México no es empleado y además tiene un elevado costo. Para evitar la complicación de enfermedades asociadas a la infección por VSR, es importante desarrollar nuevas estrategias que ayuden a reducir el número de hospitalizaciones y la tasa de mortalidad en los seres humanos.

Actualmente, una prometedora alternativa es el uso de RNAi, esta estrategia puede evitar que los virus se repliquen y en el caso de VSR ya ha sido probada con gran éxito en el ratón (por vía intranasal), sugiriendo que funcionaría también en humanos y que ofrecerá un efecto terapéutico de manera rápida, potente, económica y de fácil administración.

Finalmente, la mejor manera de controlar epidemias o brotes ocasionados por este virus es prevenir la infección sobre todo en los grupos de niños de alto riesgo. Un aspecto crítico en la prevención de este virus es taparse con las manos al toser o estornudar e inmediatamente lavárselas, esto evitaría el contagio a otras personas. También es importante que los recién nacidos sean alimentados con leche materna y evitar la exposición al humo del cigarro. A pesar de que son medidas de control simples, existe poca educación en este sentido.

Referencias bibliográficas

- Diez principales causas de mortalidad en hombres y mujeres por grupos de edad. 2007. (Consultado el 20 de enero de 2009, en <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>).
- Van Woensel JB, Van Aalderen WM, Kimpen JL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *BMJ*. 2003;327:36-40.
- Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Páramo I. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:21-4.
- Arie J, Zuckerman JEB, Pattison John R, Griffiths Paul D. Principles and practice of clinical virology. Fifth ed. England. 2004.
- Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med*. 2002;112 Suppl 6A:4S-12S.
- Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe respiratory syncytial virus infection. A systematic review. *Crit Care*. 2006;10:R107.
- Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez Yarza EG, Pérez Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:636-7.
- Jansen AG, Sanders EA, Hoes AW, Van Loon AM, Hak E. Influenza and respiratory syncytial virus associated mortality and hospitalizations. *Eur Respir J*. 2007;30:1158-66.
- Elliot AJ, Fleming DM. Influenza and respiratory syncytial virus in the elderly. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:249-58.
- De Wit E, Fouchier RA. Emerging influenza. *J Clin Virol*. 2008;41:1-6.
- Noyola DE, Alpuche Solís AG, Herrera Díaz A, Soria Guerra RE, Sánchez Alvarado J, López Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*. 2005;54:969-74.
- Manjarrez ME, Rosete DP, Rincón M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. Comparative viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol*. 2003;52:579-83.
- García García ML, Calvo Rey C, Pozo Sánchez F, et al. [Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus]. *An Pediatr Barc*. 2007;67:212.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:716-47.
- Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*. 2006;87:1805-21.
- M. David Knipe PMH. *Virology*. Fifth edition ed. 2007.
- Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 1985;66 (Pt 10):2111-24.
- Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis*. 1997;175:814-20.
- Mohapatra SS, Boyapalle S. Epidemiologic, experimental and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:495-504.
- O. David, White F, J Fenner. *Medical Virology*. Fourth ed.
- Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2001;11:103-16.
- Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc*. 2005;97:1708-13.
- Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet*. 2006;368:312-22.
- Noyola DE, Rodríguez Moreno G, Sánchez Alvarado J, Martínez Wagner R, Ochoa Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:118-23.
- Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:S13-8; discussion S8-20.

26. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 2005;352:1749-59.
27. Andrade R. Today's Microbiology in emergent and re-emergent infectious diseases. Part II VITAE. *Academia Biomédica Digital*. 2005;24.
28. Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2008;143:455-67.
29. Ebbert JO, Limper AH. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration*. 2005;72:263-9.
30. Mejías A, Chávez Bueno S, Ríos AM et al. [Asthma and respiratory syncytial virus. New opportunities for therapeutic intervention]. *An Pediatr (Barc)* 2004;61:252-60.
31. Kimpen JL. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res*. 2002;3 Suppl 1:S40-5.
32. Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe RSV bronchiolitis. *Lancet*. 2006;368:988.
33. Bitko V, Musiyenko A, Barik S. Viral infection of the lungs through the eye. *J Virol*. 2007;81:783-90.
34. Cabalka AK. Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:S41-5.
35. Makari D. Impact of RSV: Implications for Managed Care. *Managed Care*. 2009;18:2-7.
36. Carbonell Estrany X, Bont L, Doering G, Gouyon JB, Lanari M. Clinical relevance of prevention of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in preterm infants born between 33 and 35 weeks gestational age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:891-9.
37. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr*. 2003;143:S112-7.
38. Bradley JP, Bacharier LB, Bonfiglio J, et al. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics*. 2005;115:e7-14.
39. Von Linstow ML, Eugen Olsen J, Koch A, Winther TN, Westh H, Høgh B. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res*. 2006;11:329-35.
40. Sarmiento RE, Tirado R, Gómez B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res*. 2002;84:45-58.
41. Sarmiento RE, Arias CF, Méndez E, Gómez B. Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res*. 2008.
42. Singleton RJ, Redding GJ, Lewis TC et al. Sequelae of severe respiratory syncytial virus infection in infancy and early childhood among Alaska Native children. *Pediatrics*. 2003;112:285-90.
43. Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:430-9.
44. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group and maternal antibody level. *J Pediatr*. 1981;98:708-15.
45. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2003;112:1442-6.
46. Forbes M. Strategies for preventing respiratory syncytial virus. *Am J Health Syst Pharm*. 2008;65:S13-9.
47. Groothuis JR, Nishida H. Prevention of respiratory syncytial virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab). *Pediatr Int*. 2002;44:235-41.
48. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature*. 2004;430:161-4.
49. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431:343-9.
50. Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq QM. The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci*. 2009;5:97-117.
51. Mahmood ur R, Ali I, Husnain T, Riazuddin S. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnol Adv*. 2008;26:202-9.
52. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004;431:338-42.
53. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806-11.
54. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9742-7.
55. 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.
56. Martínez MA. Progress in the therapeutic applications of siRNAs against HIV-1. *Methods Mol Biol*. 2009;487:343-68.
57. Chen Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res*. 2008;25:72-86.
58. Volarevic M, Smolic R, Wu CH, Wu GY. Potential role of RNAi in the treatment of HCV infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5:823-31.
59. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*. 2005;11:50-5.