

Distrofia Muscular Duchenne: Omisión de Exon con transferencia del gen U7.

El 3 de diciembre del 2004, la publicación "Science" publicó un artículo con el título "Rescate del Músculo Ditrófico Por Medio del Mediador ARNs-U7 de Omisión de Exon" por los autores *Aurélie Goyenvalle, Adeline Vulin, Françoise Fougerousse, Leturcq de Francia, Jean-Claude Kaplan, Luis Garcia, y Olivier Danos* del Instituto Génethon en Evry cerca de París (Science 306, 1796-1799, 2004).

El Dr. Luis García presentó los resultados de este acercamiento de investigación para tratar con eficacia la distrofia muscular Duchenne en la reunión de la asociación de distrofia muscular española ASEM en Barcelona el 11 de junio del 2005, y en la conferencia del Parent Project en Cincinnati el 8 de julio del 2005. El siguiente informe es un intento de explicar los hechos científicos a las familias con muchachos con distrofia muscular (DM) Duchenne en un modo que ellas podrían comprender.

Primero, unas palabras acerca de la abreviatura "**ARN**", la cual significa "ácido ribonucleico": Su estructura molecular es una cadena de unidades alternadas de azúcar y ácido fosfórico como en las cadenas del material genético, la doble hélice del ADN. Las unidades de azúcar en el ARN son ribosa, mientras que en el ADN son desoxirribosa. Cada ribosa del ARN lleva una de las cuatro bases adenina, guanina, citosina, y uracilo, o "letras genéticas", abreviadas como A, G, C, y U. (En el ADN, la base timina, T, es usada en vez de uracilo, U). El ARN es mucho más inestable que el ADN. El ADN puede durar durante miles de años, el ARN, sin embargo, no dura mucho tiempo, la naturaleza, por lo tanto, lo usa para el transporte rápido de la información genética dentro de las células.

A continuación, la manera que la **distrofina** es hecha será explicada. La distrofina es la proteína que es necesaria para la estabilidad de las membranas de las células musculares. Las instrucciones para la biosíntesis de la distrofina están escritas en su gen con 220 223 letras genéticas en una secuencia lineal. (Las letras genéticas son científicamente llamadas *nucleótidos* o *bases pares*.) El gen de la distrofina, que está localizado en el cromosoma-X, es por mucho el gen humano más grande. El cual consiste de 79 regiones activas, los exones, y los mucho más largos intrones entre ellos. Sólo los exones contienen la información para la construcción de la proteína.

En el núcleo de las células musculares, las instrucciones enteras de las regiones de los exones e intrones del gen de la distrofina son copiadas en el ARN premensajero, ARNpre-m. Los intrones de esta copia o transcripción son eliminados entonces y los exones son unidos - empalmado juntos - uno tras

otro, al ARN mensajero. Este ARNm viaja a los ribosomas, las "fábricas" de proteínas, en el citoplasma de las células. En los ribosomas, el mensaje genético almacenado en 79 exones del ARNm es usado para la construcción de la proteína distrofina, que consiste de 3 685 aminoácidos, los componentes básicos de las proteínas. La distrofina completada entonces se mueve hasta por debajo de la membrana de la célula muscular donde forma parte de un complejo de muchas otras proteínas que es necesario para la transmisión de la fuerza muscular y la estabilidad de la membrana de la célula bajo tensión mecánica.

(Una nota: A los científicos les gusta hablar de las cosas con que ellos trabajan como si ellas fueran sólo una de cada una. Ellos dicen: *una* proteína, *la* distrofina, *el* gen, *la* fibra muscular, etc. En realidad, producen y trabajan con millones o miles de millones de ellas. Por ejemplo, hay 114 mil millones de moléculas de distrofina en un gramo de tejido de músculo.)

Ahora, la causa de la **distrofia muscular Duchenne** es explicada: Las instrucciones para creación de la distrofina en su gen comienzan con la palabra genética para el aminoácido metionina, es decir con las tres letras, la tripleta o codón ATG. Entonces, 3 684 palabras de tres letras adicionales siguen sin ningún espacio entre ellas. Cada uno de estos codones significa uno de los 20 aminoácidos diferentes que la naturaleza usa para construir proteínas. A veces, en los músculos de un muchacho, las instrucciones genéticas para hacer distrofina contienen un error, una *mutación*. Si esto ocurre, las fronteras de las palabras de tres letras detrás del error pueden haberse movido por una o dos letras, de modo que *el marco de lectura se ha movido*. Las palabras pueden significar ahora aminoácidos diferentes o hasta una señal de parada prematura como el codón TGA. Entonces, la proteína distrofina no puede ser completada. Las estructuras protectoras en las membranas de los músculos se desintegran, los músculos se deterioran y el resultado es la distrofia muscular Duchenne con todas sus consecuencias devastadoras.

Para entender lo que los investigadores del Génethon han hecho, la técnica de **omisión de exon** es explicada ahora: El objetivo de la omisión de exon, "o saltar exones", es normalizar el marco de lectura desequilibrado, hacer que la situación fuera del marco, vuelva *estar dentro del marco de lectura correcto* otra vez. Esto puede ser hecho previniendo el uso de uno o varios exones seleccionados directamente antes o después del sitio de la mutación, de modo que ellos ya no sean incluidos en el ARNm. El exon o los exones a ser omitidos tienen que tener la estructura correcta en sus fronteras de forma que normalicen el mar-

co de lectura cambiado. La información genética de estos exones omitidos no es usada entonces para la síntesis de la proteína. Cuando el marco de lectura correcto es restaurado después de la omisión, la distrofina puede ser hecha otra vez, pero será más corta que lo normal. En muchos casos, esta algo más corta distrofina todavía puede proteger las células musculares hasta cierto punto. El resultado entonces es el cambio de una distrofia Duchenne rápida en una distrofia Becker de progresión mucho más lenta.

El **empalme de los exones** es un procedimiento complicado que necesita al menos cinco factores de empalme diferentes y dos factores secundarios, todos ellos pequeños ARN's nucleares, ARNsn's, junto al menos nueve proteínas SR diferentes y, además, aproximadamente otras 250 proteínas. Las secuencias genéticas especiales dentro de un exon y sus bordes son necesarias para que la reacción de empalme proceda correctamente. Si algunas de estas secuencias son bloqueadas, tal exon seleccionado no es empalmado nunca más con sus vecinos, es *omitido*. El bloqueo puede ser causado por ARN's cortos hechos artificialmente que consisten de aproximadamente 20 letras genéticas o nucleótidos. Su secuencia debe ser construida de tal manera que ellos puedan unirse específicamente a las secuencias que promueven el empalme y desactivar entonces ese exon en particular, marcándolo de esta manera, y no sea empalmado más.

Este bloqueo funciona porque el ARN artificial tiene una secuencia que esta al revés de las secuencias que promueven el empalme, esto es un **oligo-ribonucleótido en antisentido**, abreviado como AON. El prefijo "oligo" significa que este contiene sólo unas letras genéticas. Tal AON se une exclusivamente a las secuencias del exon a ser bloqueado porque su secuencia en antisentido ha sido hecha complementaria a la de estas secuencias de modo que una estructura de Watson-Crick completamente emparejada sea posible, es decir que un U sea siempre opuesto a una A y una G enfrente de una C y viceversa.

La omisión de uno o varios exones ocurre en el núcleo de la célula en el nivel del ARN que ha copiado las instrucciones genéticas del gen. Esto significa que los AON's no cambian el gen mutado mismo. Que debido a su información dañada, podría seguir creando daño adicional a menos que los AON's estén presentes. Sin embargo, los AON's no son todavía suficientemente estables, ellos desaparecen con el tiempo, por lo tanto, ellos probablemente deben ser introducidos en los músculos repetidamente.

La técnica de omisión de exon descrita hasta ahora está siendo desarrollada por los equipos de investigación de *Judith van Deutekom* en Leiden (Holanda), *Terry Partridge* en Londres, y *Steve Wilton* en Perth

(Australia), todos ellos con el objetivo de hacer AON's estables por un suficientemente largo tiempo después de su inyección en la circulación sanguínea. Esto está siendo hecho añadiéndoles pequeñas estructuras moleculares protectoras. La omisión de exon con AON's artificialmente hechos está siendo clínicamente probada ya en muchachos con DM Duchenne en Holanda.

Los investigadores en el instituto Généthon han ampliado ahora esta técnica intentando instruir a las células musculares para hacer continuamente AON's ellas mismas de modo que estos no tuvieran que ser aplicados repetidamente. Esto puede ser conseguido transportando hacia los músculos la información genética para la construcción de los AON's. La investigación preliminar hacia este acercamiento fue realizada por los equipos de *Irene Bozzoni* en Roma y *David Schümperli* en Berna (Suiza). Su idea original era usar **ARNsn-U7s**, pequeños ARN's que son necesarios para el mantenimiento de los cromosomas, pero que tienen una estructura similar a los factores de empalme. Estos ARNsn-U7's pueden ser modificados de modo que ellos sean capaces de causar la omisión de exon. Los investigadores en Francia han desarrollado esta técnica y la han aplicado para reparar la mutación puntual en el exon 23 del gen de la distrofina del ratón- mdx distrófico. Omitiendo este exon, la señal de parada prematura causada por esta mutación, puede ser evitada.

Olivier Danos, *Luis García* y sus colegas en el instituto Généthon han añadido a la secuencia bastante corta de ADN del **gen ARNsn-U7** la información para dos secuencias en antisentido. (Es importante saber en este punto, que los ARNsn's, como todos los otros ARN's, también son "hechos" por genes.) Estas secuencias adicionales de ADN en el gen ARNsn-U7 son de 24 y 20 letras de largo y son diseñadas de tal modo que, después de que ellos son copiados en el ARN, puede unirse específicamente a dos secuencias del ARNpre-m de la distrofina del ratón. Una esta localizada al final del intron 22 y otro en el borde del exon 23 con el siguiente intron 23. Y si estas dos secuencias son bloqueadas, el exon 23 con su señal de parada prematura está siendo omitido.

A fin de transferir a este gen-U7 modificado - U7 SD23/BP22 - a los músculos, junto a este se agregaron secuencias de control adicionales, insertadas en el material genético de **virus adeno-asociados** (AAV) de una estructura genética tipo 2 con una envoltura de proteína tipo 1. Los más de 20 trillones de estos modificados e inoocuos virus fueron inyectados directamente en una parte en dos músculos diferentes de 37 ratones- mdx. Después de seis semanas, hasta el 80 % de las células de los músculos tratados tenían nueva distrofina acortada, que no contenía más los 72 ami-

noácidos determinados por la secuencia normal del exon 23. Y esta nueva distrofina estaba todavía presente un año después de esta sola inyección de los vectores, como son llamados los virus modificados. Esta nueva distrofina también había emigrado a su posición normal debajo de las membranas de las células musculares, y las células musculares "rescatadas" parecieron completamente normales bajo el microscopio. Los procesos distróficos en los músculos mdx, es decir su degeneración acelerada y regeneración, fueron completamente parados. Y no había tampoco ninguna reacción inmune contra la nueva distrofina.

Entonces, otros cinco ratones-mdx fueron tratados de forma similar, pero los virus vectores no fueron inyectados en sus músculos directamente, sino en la **circulación sanguínea** de sus patas. Después de un mes, más del 80 % de las fibras de todos los músculos chequeados de la pata tenían nueva distrofina, y también otras proteínas del complejo distrófico, las cuales fueron analizadas, habían reaparecido. Esto significa, que los sitios de unión de la nueva distrofina con estas proteínas tenían su estructura normal.

Y finalmente, la **función muscular** fue estudiada midiendo la contracción espontánea de los músculos tratados después de que ellos fueron enérgicamente alargados. La normalmente muy reducida función de los ratones-mdx había vuelto a la normalidad, si los músculos contienen más del 70 % de la nueva distrofina. Y los ratones-mdx tratados, que fueron físicamente tensionados haciéndolos correr en una rueda de ejercicio, no desarrollaron el daño muscular habitualmente encontrado en ratones-mdx no tratados.

Los resultados de experimentos tempranos con la transferencia de otros genes en los músculos de ratones, ratas, perros y monos sugieren que la transferencia de U7 con vectores virales AAV pudiera conducir a un **rescate permanente** de las fibras del músculo distrófico. En monos, los genes transferidos de esta manera fueron encontrados activos hasta por seis años. Los adenovirus no insertan las secuencias de genes que ellos llevan en los cromosomas de las células musculares, por lo tanto, el riesgo que otros genes pudieran ser alterados por la introducción del nuevo gene U7 parece ser bajo.

En experimentos preliminares realizados después del trabajo publicado en el artículo de la revista Science, la técnica de transferencia del gen-U7 fue aplicada para tratar al **perro-GRMD distrófico**. En contraste con el ratón-mdx, que no se ve significativamente impedido por la ausencia de su distrofina, el perro distrófico tiene síntomas clínicos severos similares a los de muchachos con distrofia muscular Duchenne. Su gen de la distrofina tiene una mutación puntual en la región del receptor de empalme del exon 7 de modo que este exon es eliminado y el marco de lectura después del exon eliminado es cambiado conduciendo a una señal de parada prematura con la consecuencia de que el perro no tiene ninguna distrofina en sus músculos. Omitiendo los tres exones 6, 7, y 8 simultáneamente, el marco de lectura puede ser reparado. Esta multi-omisión de exon fue posible por la transferencia de dos diferentes genes U7 modificados - U7 C6ESE2 y U7 C8ESE1 - con el vector AAV al mismo tiempo. Dos meses después de la inyección de las dos preparaciones del vector directamente en los músculos de una pata del perro, cantidades casi normales de distrofina podían ser encontradas alrededor del sitio de la inyección. Tiene que ser mostrado ahora si la nueva distrofina, que es más corta de lo normal, en efecto conduce realmente a síntomas más moderados en el perro que son comparables a aquellos de pacientes humanos de DM Becker.

En un primer **estudio clínico humano**, esta muy prometedora técnica será probada pronto en mujeres portadoras adultas de DM Duchenne para ver si el exon 51 puede ser omitido de esta manera. Como todos los nuevos procedimientos terapéuticos, esta técnica tendrá que pasar por las fases habituales de estudios clínicos. Como esta combinación de omisión de exon y transferencia génica - dos completamente nuevos acercamientos-, interfiere con la información de un gen humano, debe tomarse especial cuidado para reducir todos los riesgos posibles. Incluso si todos los futuros pasos de investigación necesarios proceden sin ninguna dificultad, esto tomará todavía varios años hasta que esta técnica esté disponible como una terapia segura y eficaz para muchachos con distrofia muscular Duchenne.

Guenter Scheuerbrandt, PhD
Im Talgrund 2
D-798874 Breitnau
Alemania
e-mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Traducción al español por:
Ricardo Rojas Caballero
Playa Rosarito 319 Fracc. Playa Sur
CP 82040, Mazatlán, Sinaloa, México
e-mail: distrofiamuscular@yahoo.com.mx