

ARN de interferencia terapéutico para enfermedades neurodegenerativas

P. González-Alegre

ARN DE INTERFERENCIA TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Resumen. Introducción. El descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi), una vía biológica de control de expresión génica, ha revolucionado el campo de la investigación biomédica. De las muchas aplicaciones del ARNi, quizás su explotación terapéutica sea la más prometedora. Un grupo de enfermedades donde el uso de ARNi terapéutico se está explorando activamente lo constituyen los trastornos neurodegenerativos. Objetivo. Presentar tanto al neurólogo clínico como al investigador básico un sumario actualizado del desarrollo de ARNi terapéutico para enfermedades neurodegenerativas. Desarrollo. El progreso técnico en la manipulación del ARNi en neuronas y los avances recientes en el conocimiento de la patogenia de los procesos neurodegenerativos han facilitado el diseño de ARNi terapéutico tanto para enfermedades hereditarias como idiopáticas. Varios ensayos preclínicos se han completado con éxito en modelos animales, allanando el camino hacia el diseño de ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, antes de llegar a ese punto hay que completar más estudios experimentales en animales para demostrar la eficacia de esta modalidad terapéutica y, más importante aún, para predecir los posibles efectos adversos de esta intervención en el cerebro humano. Conclusión. Aunque todavía en estadios preclínicos, la explotación del ARNi con fines terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas está generando resultados muy prometedores. La evolución de este campo en los próximos años puede ser crítica para iniciar su aplicación clínica. [REV NEUROL 2008; 47: 641-7]

Palabras clave. ARN de interferencia. ARNi. Enfermedades neurodegenerativas. MicroARN. Terapia génica. Vectores virales.

INTRODUCCIÓN

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo de control de expresión génica, descubierto hace una década [1], que ha tenido un impacto extraordinario en el campo de la investigación biomédica, llevando a la concesión del premio Nobel a sus descubridores en 2006 [2]. Las consecuencias de las investigaciones de Craig Mello y Andrew Fire incluyen, por ejemplo, el descubrimiento de los microARN (miARN) [3-5], pequeños genes no codificadores que desempeñan un papel esencial en la regulación de procesos biológicos y patológicos como el desarrollo y plasticidad neuronales [6,7] o el cáncer [8]. Además, el ARNi es en la actualidad una técnica empleada rutinariamente en el laboratorio de biología donde, por ejemplo, facilita el estudio de la función de genes específicos o la disección funcional de vías moleculares [9-13]. No obstante, la aplicación del ARNi más espectacular quizás sea su explotación con fines terapéuticos, un campo de investigación muy activo y prometedor para numerosas enfermedades hasta ahora incurables [14-17].

Como se detallará más adelante, el ARNi funciona bloqueando la expresión de genes con extraordinaria especificidad. Su uso terapéutico se basa en el 'silenciamiento' de genes clave en el desarrollo de procesos patogénicos [14-17]. Varios grupos de enfermedades se están explorando exhaustivamente como candidatas al desarrollo del 'silenciamiento' de genes con fines terapéuticos, incluyendo infecciones [18], cáncer [19,20] o tras-

tornos neurodegenerativos [21-24]. En infecciones virales, el objetivo es 'silenciar' genes del agente infeccioso esenciales para la patogenicidad. En enfermedades neoplásicas, donde se produce una gran desregulación transcripcional, genes implicados en su patogenia son candidatos a ser suprimidos con ARNi. Esta revisión se centra en el tercer grupo de patologías en las que el desarrollo de ARNi terapéutico se está explorando muy activamente: las enfermedades neurodegenerativas.

Debido a su creciente prevalencia y el gran coste económico y emocional que conllevan, el desarrollo de terapias capaces de frenar los procesos neurológicos causados por muerte neuronal, como las enfermedades de Parkinson (EP) o Alzheimer (EA), constituye una prioridad biomédica. Aunque aún no tenemos un conocimiento detallado del proceso patogénico que origina la muerte neuronal en estas enfermedades, en muchas se han identificado componentes esenciales que, en caso de eliminarse o inhibirse, llevarían a la interrupción del proceso patobiológico. En estos casos es cuando el ARNi se propone como alternativa terapéutica. El objetivo de este artículo es revisar el estado actual del desarrollo del ARNi terapéutico para enfermedades neurodegenerativas, predecir los problemas a los que nos enfrentamos antes de poder usar esta modalidad terapéutica en humanos y, finalmente, identificar qué camino queda por recorrer antes de plantear el inicio de ensayos clínicos.

EL PROCESO DE ARNi

El componente clave o efector del proceso de ARNi es un pequeño ARN de doble hebra (ARNdh) de unos 20-28 nucleótidos de longitud (Fig. 1) [1,10,25]. El ARNdH puede ser el producto de genes que codifican los miARN endógenos en células de mamíferos, ser directamente introducido por el investigador en la célula como un ARN en doble hebra (ARNsi, del inglés *short interfering*) o como vectores de ADN que la maquinaria celular empleará para generar horquillas de ARNdH (ARNsh, del inglés *short hairpin*). A continuación se describe la vía de los miARN

Aceptado tras revisión externa: 16.10.08.

Servicio de Neurología. Carver College of Medicine. University of Iowa. Iowa City, Iowa, Estados Unidos.

Correspondencia: Pedro González Alegre MD. Department of Neurology. University of Iowa Hospitals and Clinics. 200 Hawkins Drive. Iowa City, IA 52242, USA. E-mail: pedro-gonzalez-alegre@uiowa.edu

Trabajo financiado por NIH/NINDS (National Institutes of Health/National Institute of Neurological Diseases and Stroke) y DMRF (Dystonia Medical Research Foundation).

© 2008, REVISTA DE NEUROLOGÍA

endógenos (Fig. 2) [3,4,26,27] y se indican las pequeñas diferencias con los elementos que se emplean comúnmente para la manipulación exógena de esta vía, incluyendo ARNsi y ARNsh.

Los miARN están generalmente codificados por genes agrupados en *clusters* en áreas genómicas no codificadoras, o incluso dentro de genes codificadores en secuencias no codificadoras, como intrones [5,6,26]. Normalmente, estos genes son transcritos por la ARN polimerasa II, generando miARN primarios, procesados en el núcleo por Drosha, una ARNasa, para generar pre-miARN en forma de horquilla [28]. Estos pre-miARN son exportados al citoplasma activamente por la exportina 5 [29]. Una vez en el citoplasma, el pre-miARN es procesado por otra ARNasa, Dicer, para formar dos hebras de ARN complementarias mediante la eliminación del bucle que las unía en forma de horquilla [30]. Una de estas hebras, conocida como guía o antisentido, será parcialmente complementaria a la secuencia diana del ARN mensajero (ARNm) –perfectamente complementarias en el caso de ARNsi y ARNsh– [25]. La secuencia diana de los miARN está normalmente en la región no traducida 3' (en el caso de ARNsi y ARNsh, la diana se sitúa en secuencias codificadoras). Una vez que la hebra antisentido reconoce el ARNm diana, se forma el complejo multiproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) y la hebra complementaria se degrada [31]. RISC inhibe el proceso de traducción del ARNm diana, acumulándose en el citoplasma celular en cuerpos de procesamiento [32], o directamente destruye el ARNm en el caso de ARNsi o ARNsh. En cualquier caso, se previene la síntesis de una proteína. La exquisita especificidad de este proceso la aporta la secuencia de los ARNdh. Desde el punto de vista terapéutico, el objetivo es generar ARNdh que prevengan la producción de proteínas clave en el desarrollo del proceso patológico.

ARNi TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
Búsqueda de dianas terapéuticas

En la mayoría de enfermedades neurodegenerativas no se han identificado dianas farmacológicas para el desarrollo terapéutico tradicional [33]. Sin embargo, en muchos casos, el conocimiento de eventos moleculares implicados en su patogénesis ha desmascarado genes esenciales para ese proceso. Como muchas de estas enfermedades son muy prevalentes, incurables y llevan a minusvalías crónicas o al fallecimiento del enfermo, el desarrollo de estrategias terapéuticas mediante ARNi, independientemente del conocimiento de su patobiología, constituye una alternativa muy atractiva. Del mismo modo, en enfermedades neurológicas raras, la inversión en investigación suele ser limitada, retrasando el avance en el conocimiento biológico que podría llevar al desarrollo racional de tratamientos. En este caso, la manipulación del ARNi con fines terapéuticos también se ha convertido en pocos años en una opción prometedora [14,16].

Con el fin de desarrollar con éxito ARNi terapéutico para enfermedades neurodegenerativas [13,22-24,34], la primera pregunta a plantearse es qué tipo de dianas terapéuticas debemos buscar. En algunas enfermedades, como las heredadas de forma

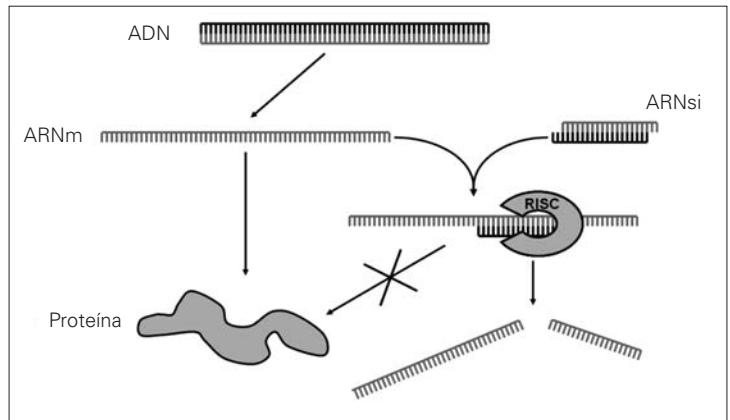


Figura 1. Representación del proceso de ARNi. El ADN que codifica genes es transcrito a ARNm, y éste, traducido a una proteína. En ARNi, un ARNdh complementario al ARNm lo identifica y activa el complejo RISC, que media la destrucción del ARNm y evita su traducción.

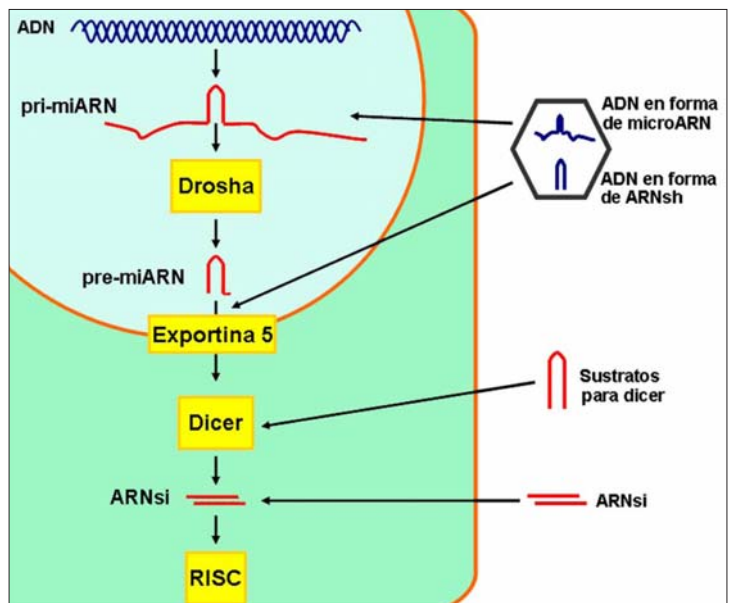


Figura 2. Manipulación exógena de la vía de miARN/ARNi. Los genes que codifican miARN se transcriben y procesan en el núcleo, se exportan al citoplasma –donde se procesan de nuevo– y finalmente se incorporan al complejo silenciador (RISC). La manipulación exógena se puede producir por medio de ADN, introducido en las células en forma de plásmidos de expresión o vectores virales. Estos vectores precisan entrar al núcleo, transcribirse, procesarse y exportarse al citoplasma. Alternativamente, puede sintetizarse ARNdh *in vitro* e introducirlo directamente en la célula, evitando el procesamiento y exportación nucleares.

autosómica dominante, la respuesta es obvia. Cuando el producto proteico de un gen mutado desencadena una enfermedad hereditaria a través de un mecanismo tóxico, el ‘silenciamiento’ directo de la expresión de ese gen con ARNi debería derivar en un beneficio terapéutico. Muchas enfermedades neurodegenerativas hereditarias encajan en este modelo, incluidas, por ejemplo, las causadas por expansión de repeticiones de poliglutaminas [35]. En este grupo de enfermedades, que incluyen la enfermedad de Huntington y varias ataxias espinocerebelosas, la mutación causa un plegamiento incorrecto en la proteína mutada [36,37]. Esto, a su vez, inicia una cascada molecular que lleva a disfunción y muerte neuronal. Algunas de las estrategias terapéuticas que se han explorado en estas enfermedades actúan distalmente en la cascada molecular, mientras que el ‘silencia-

miento' de la proteína mutada con ARNi impediría la expresión del elemento patógeno, atacando el proceso patogénico en su raíz. Otras enfermedades heredadas de modo dominante que se ajustan a esta categoría, y en las cuales la aplicación terapéutica del ARNi se está investigando activamente, incluyen las formas familiares de EA, esclerosis lateral amiotrófica y demencia frontotemporal.

Los ARNdh diseñados como moléculas terapéuticas para enfermedades heredadas de forma autosómica dominante frecuentemente 'silencian' la expresión del gen mutado y el normal. Sin embargo, si los genes involucrados llevan a cabo una función esencial, sería necesario suprimir exclusivamente la expresión del alelo mutado, pero no del normal. Esta técnica, conocida como 'silenciamiento' aleloespecífico, se beneficia de la exquisita especificidad del ARNi, incluso facilitando la generación de ARNdh, que 'silencia' exclusivamente un alelo, incluso cuando la diferencia en su secuencia con el otro alelo sea un solo nucleótido [38-42].

El 'silenciamiento' aleloespecífico también se aplica a las enfermedades dominantes causadas por un mecanismo de acción dominante negativo. En estos casos, la proteína mutada no funciona correctamente e impide el funcionamiento de la proteína no mutada, llevando a una pérdida de función global. Suprimir la expresión de ambas proteínas, la mutada y la normal, no haría sino empeorar el proceso, haciendo necesario el 'silenciamiento' aleloespecífico. Un ejemplo se encuentra en la distonía hereditaria más común, conocida como distonía de torsión tipo 1 o DYT1 [43]. En esta enfermedad, la pérdida de tres nucleótidos en el gen *TOR1A* lleva a la delección de un ácido glutámico en la proteína torsina A. La torsina A normalmente se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático. Sin embargo, cuando lleva la mutación causante de la DYT1, se redistribuye a la membrana nuclear, donde secuestra a la torsina A no mutada, causando la pérdida de esta proteína en el retículo endoplasmático [44]. La diferencia entre ambos alelos es más que suficiente para diseñar ARNdh que 'silencie' el alelo mutado, pero no el normal [38]. Empleando ARNsh se ha conseguido 'silenciar' la torsina A mutada en células neuronales, restaurando la localización de la proteína no mutada en el retículo endoplasmático y, presumiblemente, recuperando su función normal [45]. Este ejemplo ilustra el tremendo potencial del 'silenciamiento' aleloespecífico.

Las enfermedades heredadas de modo dominante son candidatas lógicas para el desarrollo de terapia con ARNi, pero ¿qué sucede con enfermedades dominantes causadas por haploinsuficiencia (pérdida de función) o en enfermedades recesivas? En estos casos, los genes mutados no son una diana lógica para ARNi, ya que 'silenciar' un gen que ha perdido su función no generaría beneficio alguno. Sin embargo, en esos casos también se pueden encontrar dianas terapéuticas [46]. Por ejemplo, la pérdida de función de una proteína puede desencadenar una cascada patogénica que incluya genes candidatos al 'silenciamiento' terapéutico con ARNi. Un ejemplo es la esclerosis tuberosa, causada por mutaciones que originan la inactivación de los genes que codifican tuberina o hamartina. Estas proteínas forman un complejo que reprime una vía molecular que estimula la proliferación celular. En la esclerosis tuberosa, la pérdida de función de tuberina o hamartina causa que este proceso quede sin control, provocando el desarrollo de las lesiones características de esta enfermedad. El 'silenciamiento' de algún componente clave de esta vía molecular podría prevenir la proliferación celular descontrolada, interrumpiendo el proceso patogénico [22].

Hasta ahora se ha discutido la identificación de dianas moleculares para el desarrollo de ARNi terapéutico en enfermedades hereditarias. Sin embargo, la mayoría de pacientes sufre casos idiopáticos. Afortunadamente, el conocimiento del proceso patogénico adquirido en el estudio de pacientes con bases hereditarias ha sido muy útil para identificar dianas en la enfermedad esporádica. Por ejemplo, en un hallazgo inesperado durante el estudio de EP familiar, se encontró que la expresión de la α -sinucleína, mutada en casos muy infrecuentes de EP heredada, podría ser un componente esencial en la patogenia de la EP idiopática [47]. Esta tesis ha sido apoyada experimentalmente, por ejemplo, por estudios que demuestran que ratones que no expresan este gen son resistentes al desarrollo de la EP inducida por MPTP [48,49]. Consecuentemente, la α -sinucleína quizás represente una diana terapéutica para ARNi en la EP, independientemente de su etiología.

Una situación similar se encuentra en la EA. La EA hereditaria puede ser causada por mutaciones en la proteína precursora de amiloide (PPA) o en los distintos enzimas que participan en su procesamiento y que llevan a la deposición extracelular de fragmentos anormales del péptido β -amiloide [50]. Numerosos estudios en pacientes con EA, modelos animales y celulares sugieren que ese proceso también es clave en la EA esporádica [51,52]. Por ello, esta cascada molecular ofrece varias dianas para el desarrollo de ARNi terapéutico tanto para EA hereditaria como idiopática.

Diseño de la intervención terapéutica

Como se acaba de discutir, en muchas enfermedades neurodegenerativas, heredadas o esporádicas, se pueden identificar dianas terapéuticas para el diseño de ARNi. Para iniciar el desarrollo de ARNi terapéutico se han planteado cuatro preguntas a responder experimentalmente para cada enfermedad [24]: ¿qué agente efector debemos utilizar?, ¿cómo llevarlo a las células diana?, ¿dónde se encuentra la diana anatómica?, ¿cuándo se debe aplicar el agente terapéutico?

Los agentes efectores de ARNi hasta ahora empleados en ensayos preclínicos se pueden dividir en ARNsi o ARNsh (Fig. 2). Cuando se emplean ARNsi, el ARNdh se sintetiza *in vitro* y se aplica directamente a las células diana. Al inyectar directamente el ARN, éste no necesita ser importado al núcleo y procesado por la maquinaria descrita con anterioridad, sino que directamente identifica su ARNm diana y se incorpora a RISC (Fig. 2). Esto tiene ventajas en cuanto a la prevención de efectos adversos, como se discutirá más adelante. Sin embargo, la difusión de ARNsi en tejido cerebral es limitada y su vida media, corta, aunque su estabilidad ha mejorado con la incorporación de modificaciones químicas como la conjugación de colesterol [16]. Como estos agentes no atraviesan la barrera hematoencefálica, se requeriría su administración repetida mediante inyecciones locales, lo cual resultaría poco práctico. En el caso de los ARNsh, el objetivo consiste en introducir en las células diana vectores de ADN que las células emplearán para generar los ARNdh. Aunque esto puede facilitar la producción sostenida de ARNsh, evitando la necesidad de administración repetida, los ARNsh tienen que importarse y procesarse en el núcleo antes de su exportación y procesamiento al citoplasma (Fig. 2). Aunque en teoría esto puede ser beneficioso —ya que al recorrer el camino de los miARN endógenos, su procesamiento se presume correcto—, la sobreexpresión de estas horquillas puede saturar la vía de miARN endógena, como se discutirá posteriormente, acarreado conse-

cuencias negativas para la función neuronal. La elección final de ARNsi o ARNsh vendrá determinada por las características de la enfermedad a tratar.

La segunda pregunta se refiere al vehículo que se empleará para llevar el agente efector, ARNsi o ARNsh, a las neuronas diana. El mayor determinante de esta elección es el agente efector en sí. Para llevar ARNsi a las células diana, el método empleado actualmente es la inyección directa de ARNsi modificados químicamente [16]. En el caso de los ARNsh, como se tratan de vectores de ADN, la inyección directa en el parénquima cerebral no funciona, ya que no son internalizados por las neuronas. En este caso, el método más extendido es el uso de vectores virales neurotrópicos. Las mejoras en el diseño de virus recombinantes para transducir neuronas en el sistema nervioso central [53] han hecho que, hasta ahora, haya sido el método más empleado en ensayos preclínicos de ARNsi terapéutico en modelos animales. Otro método empleado para llevar ARNsh al sistema nervioso

central ha sido el uso de inmunoliposomas que encapsulan estos vectores de expresión de ADN [54]. Al igual que con los ARNsi, los avances en el diseño de distintos vehículos para transducir neuronas pueden mejorar significativamente estas técnicas en un futuro cercano.

Las dos últimas preguntas, el dónde y cuándo aplicar esta terapia, dependen plenamente de las características de la enfermedad. Cuando un proceso neurodegenerativo afecta a una región anatómica concreta, la inyección directa de ARNsi o ARNsh en esa región es el método más apropiado. Sin embargo, en muchos de estos procesos patológicos, el sustrato neuroanatómico de la enfermedad es multifocal o extenso, lo cual complica el proceso. En este caso puede considerarse la administración continua o repetida de ARNsi en el líquido cefalorraquídeo, un método empleado con la tecnología antisentido en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica [55], o bien la selección como objetivo terapéutico del núcleo que acarreé la mayor carga neuropatológica para administrar localmente vectores expresando ARNsh. El cuándo llevar a cabo la administración de estos compuestos terapéuticos también lo definirá la enfermedad a estudio. Para frenar la progresión de ésta se debe intervenir lo antes posible. En enfermedades esporádicas, a falta de métodos eficaces para el diagnóstico en estadios preclínicos, sólo se podría intervenir

Tabla. Ensayos preclínicos en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.

	Modelo animal	Diana terapéutica	Compuesto terapéutico	Refs.
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	SCA1 (Q82)	Ataxina 1	rAAV1-ARNsh	[57]
Enfermedad de Huntington	HD-N171-82Q	Huntingtina	rAAV1-ARNsh	[64]
	R6/1		rAAV5-ARNsh	[66]
	R6/2	Liposomas-ARNsi (infusión en LCR)	[67]	
	HD190QG	rAAV5	[65]	
	HD (Q140) (<i>knock in</i>)	rAAV2/1-miRNA	[68]	
	Ratas-AAV-huntingtina (Q82) ^a	rAAV1/2-ARNsh	[69]	
Esclerosis lateral amiotrófica familiar	SOD1(G93A)	SOD1	Lentivirus-ARNsh	[59]
	SOD1(G93A)		Lentivirus-ARNsh	[60]
	SOD1(G93A)		Animal transgénico-ARNsh ^b	[61]
	SOD1(G93A)		Animal transgénico-ARNsh ^b	[58]
	SOD1(G93A)		rAAV6-ARNsh (intravenoso)	[62]
Enfermedad de Parkinson	Lentivirus (α -sinucleína) ^a	α -sinucleína	Lentivirus-ARNsh	[63]
Enfermedad de Alzheimer	APP doble transgénico	BACE1	Lentivirus-ARNsh	[71]
	Lentivirus (PPA) ^a	PPA	VHS-ARNsh	[70]
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Inoculación intracerebral de <i>scrapie</i> ^a	Proteína prión endógena	Lentivirus-ARNsh	[72]
	Inoculación intracerebral de proteína prión ^a		Lentivirus-ARNsh	[73]

^a Modelos generados inyectando un vector viral que codifica el transgén en un área cerebral específica o por inoculación intracerebral de la proteína prión; ^b Se generaron animales transgénicos expresando un ARNsh terapéutico y se cruzaron con el modelo de la enfermedad. LCF: líquido cefalorraquídeo; VHS: virus herpes simple; rAAV, virus adenoasociado recombinante.

al llegar al diagnóstico clínico. Sin embargo, en enfermedades hereditarias, la disponibilidad del diagnóstico genético facilita la identificación de sujetos portadores de mutaciones patogénicas en el período presintomático. En casos como la enfermedad de Huntington, donde la penetrancia de la mutación es completa, podrían diseñarse intervenciones para aplicarlas en cuanto estudios cognitivos o de neuroimagen demuestren el inicio de la enfermedad, aunque el sujeto aún no la manifieste. Sin embargo, en otros casos, la aplicación de la terapia en portadores de la mutación asintomáticos no sería deseable. Un ejemplo es la DYT1, donde la penetrancia de la mutación es limitada y sólo un tercio de sus portadores desarrolla la enfermedad [43]. En ese caso, llevar a cabo una intervención invasiva en todos los portadores de la mutación no resultaría lógico. Por ello, al igual que en enfermedades esporádicas, la terapia debería aplicarse tras la aparición de las manifestaciones clínicas, pero con la ventaja de que el diagnóstico genético facilita la identificación de portadores de la mutación a los cuales resulta posible evaluar periódicamente para lograr una detección precoz.

En resumen, el compuesto terapéutico y el modo de aplicación al sistema nervioso central lo condicionan fundamentalmente las características clínicas, genéticas y anatómicas de cada enfermedad neurodegenerativa.

Estado actual del desarrollo de ARNi terapéutico

En los últimos años se han conseguido avances muy importantes en el campo del ARNi terapéutico en el sistema nervioso central. Aunque aún no se ha iniciado su aplicación en humanos en estas enfermedades, se están llevando a cabo ensayos clínicos en enfermos con degeneración macular o infecciones por virus respiratorio sincitial. En estos casos, los compuestos terapéuticos son ARNsi modificados químicamente. Aunque no se trata de enfermedades cerebrales, estos estudios pueden proporcionar información muy útil en cuanto a eficacia y efectos adversos de la terapia con ARNi. En enfermedades neurodegenerativas, varios estudios preclínicos se han completado en modelos animales.

El laboratorio de Davidson [56] fue el primero en demostrar la posibilidad de manipular el proceso de ARNi en neuronas *in vivo*. En ese estudio se emplearon ratones transgénicos que expresan la proteína GFP (*green fluorescent protein*), cuya expresión se detecta con microscopía de fluorescencia. El éxito logrado con inyecciones intracerebrales de un vector viral codificando un ARNsh con la GFP como diana demostró que el ‘silenciamiento’ de genes en el sistema nervioso central mediante ARNi es factible.

A raíz de ese estudio se iniciaron investigaciones en distintos modelos animales de enfermedades neurológicas. El primer estudio se realizó en un modelo transgénico de ataxia espinocerebelosa tipo 1, en el cual la ataxina 1 humana con 82 glutaminas se expresa en neuronas cerebelosas. La inyección de un vector viral codificando un ARNsh capaz de suprimir eficazmente la expresión de este transgén previno el fenotipo citológico en neuronas de Purkinje, el desarrollo de atrofia cerebelosa y las anomalías en la función motora típicas de este modelo [57]. Desde entonces se han publicado numerosos ensayos preclínicos en modelos de otras enfermedades neurodegenerativas (Tabla). En la mayoría de estos estudios, el método empleado ha sido el mismo: a ratones transgénicos que expresaban un gen mutado que causa muerte neuronal y que desarrollaban fenotipos anormales se los trató con vectores virales codificando ARNsh, siendo su diana el transgén, y se demostró la prevención parcial del proceso patológico. Estos estudios se completaron en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica familiar [58-62], EP[63] y enfermedad de Huntington [64-69].

Sin embargo, en otros estudios no se suprimió la expresión del transgén en el modelo animal, sino que se ‘silenciaron’ proteínas endógenas involucradas en el proceso patogénico, tanto en enfermedad familiar como esporádica. En un estudio muy interesante se empleó un ratón transgénico modelo de la EA en el cual la sobreexpresión de la PPA mutada lleva al desarrollo de fenotipos patológicos y cognitivos. En vez de ‘silenciar’ el transgén, como se hizo en otro estudio [70], los investigadores emplearon un vector viral para suprimir la expresión del gen del ratón que codifica BACE1, un enzima que participa en el procesamiento de la PPA generando fragmentos patogénicos de β -amiloide. A diferencia de estudios anteriores, el compuesto terapéutico se inyectó en los estadios sintomáticos iniciales, reflejando la intervención que se debería llevar a cabo en humanos, y se consiguió frenar y revertir parcialmente el fenotipo patológico y cognitivo [71]. Siguiendo unos principios similares, en un modelo de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob generado mediante la inoculación intracerebral de la proteína prión mutada, el ‘silenciamiento’ mediante ARNi del gen prión endógeno del ratón, necesario para que la proteína inoculada ejerza su actividad patogénica, previno el desarrollo de la enfermedad [72,73].

En resumen, estudios preclínicos en distintos modelos animales han demostrado la eficacia del ARNi terapéutico en la prevención o reversión de distintos fenotipos asociados a enfermedades neurodegenerativas. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con vectores virales. Uno de los empleados en estos estudios, el virus adenoasociado recombinante –*recombinant adeno-associated virus* (rAAV)–, se ha usado en ensayos clínicos de terapia génica en humanos con EP sin efectos adversos y, por tanto, podría emplearse como vehículo en el diseño de ensayos clínicos con ARNi terapéutico.

Posibles reacciones adversas a la manipulación terapéutica del ARNi

Aunque la mayoría de los estudios iniciales de ARNi terapéutico se basaron, lógicamente, en demostrar su eficacia, más recientemente se han comenzado a explorar sus posibles efectos adversos. Éstos se pueden dividir en cuatro grandes grupos: toxicidad derivada del vehículo empleado, ‘silenciamiento’ de genes no diana, activación de una respuesta de interferón y, finalmente, saturación de la vía endógena de miARN.

La toxicidad del vehículo, viral o no, no parece que vaya a ser un obstáculo significativo. Algunos de estos virus, como el rAAV, ya se han empleado en humanos sin reacciones adversas significativas. En cuanto a la inyección directa de ARNsi modificados químicamente, también se ha llevado a cabo en humanos, aunque fuera del sistema nervioso.

Otra situación que podríamos encontrarnos sería el ‘silenciamiento’ de genes con secuencia similar al ARNm diana que puede derivar en toxicidad. El uso de predicción bioinformática, complementada con estudios biológicos –por ejemplo, observando si estos ARNdh ‘silencian’ genes no diana en células madre diferenciadas en el tipo celular a tratar–, podría ayudar a predecir este problema [74,75].

Una de las ventajas que se suponen a la aplicación terapéutica del ARNi es que los ARN de 30 o menos nucleótidos no deberían activar la respuesta de interferón, un problema que ha limitado el desarrollo de la tecnología antisentido con ARN más largos. Sin embargo, experimentos iniciales con ARNi generaron resultados contradictorios [76-78]. Aunque un estudio en neuronas de ratón infectadas con distintos vectores virales codificando ARNsh no encontró activación de esta respuesta [45], todos los estudios terapéuticos en animales deberían analizar cuidadosamente esta posibilidad.

Quizás la mayor preocupación actual sea la posibilidad de saturar la vía de miARN endógena. En un estudio publicado en 2006, la administración de ARNsh a un ratón con el fin de ‘silenciar’ genes en el hígado causó hepatotoxicidad y la muerte del animal [79]. Los altos niveles de expresión de los ARNsh en el núcleo se identificaron como causa de esta toxicidad, al saturar la exportina 5. En consecuencia, los miARN endógenos, que utilizan esta proteína para su exportación al citoplasma, se acumularon en el núcleo como pre-miARN. Más recientemente se ha observado un problema similar en neuronas, lo que enfatiza que hay que tener muy en cuenta este mecanismo de toxicidad en la evaluación de ensayos terapéuticos [68]. Sin embargo, al menos dos métodos han demostrado evitar eficazmente esta complicación: la administración de ARNsi en vez de ARNsh –los cuales no entran en el núcleo y por tanto no precisan de la función de la exportina 5 [80]– y la introducción de pequeñas modificaciones en los ARNsh para hacerlos más similares a miARN –lo cual ha demostrado eliminar la toxicidad

dad de los ARNsh sin afectar a su eficacia [68]–. Hasta que se demuestre la ausencia de toxicidad de esta modalidad terapéutica en humanos, los primeros ensayos clínicos deberían llevarse a cabo con ARNsi, ya que su efecto perdura sólo una o dos semanas, o con vectores virales que expresen ARNdh de forma regulada, es decir, que en caso de toxicidad pueda suprimirse su expresión.

CONCLUSIONES

Aunque aún es necesario completar más experimentos terapéuticos en animales, los avances recientes en el campo del ARNi terapéutico para enfermedades neurodegenerativas hacen que constituya una opción terapéutica muy prometedora. En ausencia de complicaciones significativas es posible que en la próxima década se inicien ensayos clínicos. Quizás las enfermedades en que se ha avanzado más en estudios preclínicos –enfer-

medad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica– podrían ser las primeras en llegar a ese punto. Otros trastornos, como las ataxias espinocerebelosas tipos 1 ó 7, aunque más raros, son también buenas candidatas para demostrar la eficacia de este método terapéutico. En el caso de la ataxia espinocerebelosa tipo 1, porque el fenotipo en animales es parcialmente reversible, la eliminación del gen que codifica la ataxina 1 no tiene consecuencias significativas y la diana anatómica, el cerebelo, es accesible. Y en el caso de la ataxia espinocerebelosa tipo 7, al presentar patología retiniana, podrían iniciarse ensayos mediante inyecciones locales en el globo ocular con ARNsi, como ya se ha realizado para la degeneración macular, antes de pasar a su administración directa al sistema nervioso. Cualquiera que sea el camino por donde se llegue, el empleo de ARNi terapéutico en enfermedades neurodegenerativas en la práctica clínica neurológica podría ser una realidad en un futuro no muy lejano.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Paulson H, González-Alegre P. RNAi gets its prize. *Lancet Neurol* 2006; 5: 997-9.
3. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 223-9.
4. Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-52.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-5.
6. Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 911-20.
7. Kuss AW, Chen W. MicroRNAs in brain function and disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008; 8: 190-7.
8. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 4-9.
9. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-9.
10. Valencia-Sánchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006; 20: 515-24.
11. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* 2005; 56: 401-23.
12. Miller VM, Paulson HL, González-Alegre P. RNA interference in neuroscience: progress and challenges. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 1195-207.
13. Davidson BL, Boudreau RL. RNA interference: a tool for querying nervous system function and an emerging therapy. *Neuron* 2007; 53: 781-8.
14. Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA* 2005; 293: 1367-73.
15. Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; 126: 231-5.
16. Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 711-9.
17. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 173-84.
18. Ketzinel-Gilad M, Shaul Y, Galun E. RNA interference for antiviral therapy. *J Gene Med* 2006; 8: 933-50.
19. Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 217-27.
20. Izquierdo M. Terapia génica en neurooncología. *Rev Neurol* 2006; 43: 613-7.
21. González-Alegre P. Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: from promise to progress. *Pharmacol Ther* 2007; 114: 34-55.
22. Davidson BL, Paulson HL. Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 2004; 3: 145-9.
23. González-Alegre P, Paulson HL. Technology insight: therapeutic RNA interference –how far from the neurology clinic? *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 394-404.
24. Rodríguez-Lebrón E, González-Alegre P. Silencing neurodegenerative disease: bringing RNA interference to the clinic. *Expert Rev Neurother* 2006; 6: 223-33.
25. Martínez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-74.
26. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
27. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-85.
28. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16: 861-5.
29. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.
30. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8.
31. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
32. Liu J, Valencia-Sánchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 719-23.
33. DeKosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 2003; 302: 830-4.
34. Farah MH. RNAi silencing in mouse models of neurodegenerative diseases. *Curr Drug Deliv* 2007; 4: 161-77.
35. Paulson HL. Toward an understanding of polyglutamine neurodegeneration. *Brain Pathol* 2000; 10: 293-9.
36. Gazulla J. Actualización en neuroquímica y terapéutica farmacológica de las ataxias cerebelosas. *Rev Neurol* 2007; 45: 31-41.
37. García-Ramos R, Del Val-Fernández J, Catalán-Alonso MJ, Barcia-Albacar JA, Matías-Guiu J. Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. *Rev Neurol* 2007; 45: 437-41.
38. González-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, Paulson HL. Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant Torsin A. *Ann Neurol* 2003; 53: 781-7.
39. Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Ther* 2006; 13: 509-16.
40. Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7195-200.
41. Rodríguez-Lebrón E, Paulson HL. Allele-specific RNA interference for neurological disease. *Gene Ther* 2006; 13: 576-81.
42. Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J, et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet* 2006; 2: e140.
43. González-Alegre P. The inherited dystonias. *Semin Neurol* 2007; 27: 151-8.
44. González-Alegre P, Paulson HL. Aberrant cellular behavior of mutant torsin A implicates nuclear envelope dysfunction in DYT1 dystonia. *J Neurosci* 2004; 24: 2593-601.
45. González-Alegre P, Bode N, Davidson BL, Paulson HL. Silencing primary dystonia: lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci* 2005; 25: 10502-9.
46. De Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, El Bekay R, Decara-Del Olmo J, Sánchez-Salido L, Bermúdez-Silva FJ, et al. Modelos experimentales

- utilizados en la investigación de trastornos genéticos que cursan con discapacidad intelectual. *Rev Neurol* 2006; 42 (Supl 1): S85-92.
47. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
 48. Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, et al. Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14524-9.
 49. Campos-Romo A. Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol* 2008; 46: 167-74.
 50. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.
 51. Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 2004; 140: 627-38.
 52. Sarasa M. Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2006; 42: 297-301.
 53. Davidson BL, Breakefield XO. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 353-64.
 54. Pardridge WM. Intravenous, non-viral RNAi gene therapy of brain cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1103-13.
 55. Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290-6.
 56. Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1006-10.
 57. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10: 816-20.
 58. Saito Y, Yokota T, Mitani T, Ito K, Anzai M, Miyagishi M, et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 2005; 280: 42826-30.
 59. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 2005; 11: 429-33.
 60. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 2005; 11: 423-8.
 61. Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z. Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 578-86.
 62. Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther* 2008; 16: 1018-25.
 63. Sapru MK, Yates JW, Hogan S, Jiang L, Halter J, Bohn MC. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol* 2006; 198: 382-90.
 64. Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5820-5.
 65. Machida Y, Okada T, Kurosawa M, Oyama F, Ozawa K, Nukina N. rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 190-7.
 66. Rodríguez-Lebrón E, Denovan-Wright EM, Nash K, Lewin AS, Mandel RJ. Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 2005; 12: 618-33.
 67. Wang YL, Liu W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res* 2005; 53: 241-9.
 68. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5868-73.
 69. Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, Klugmann M, During MJ, Young D. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 2008; 16: 947-56.
 70. Hong CS, Goins WF, Goss JR, Burton EA, Glorioso JC. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo. *Gene Ther* 2006; 13: 1068-79.
 71. Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1343-9.
 72. Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, et al. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 3204-10.
 73. White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10238-43.
 74. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.
 75. Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1834-47.
 76. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34: 263-4.
 77. Heide JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1579-82.
 78. Sledz CA, Holko M, De Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 834-9.
 79. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006; 441: 537-41.
 80. John M, Constien R, Akinc A, Goldberg M, Moon YA, Spranger M, et al. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature* 2007; 449: 745-7.

TERAPEUTIC RNA INTERFERENCE FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES

Summary. Introduction. *The discovery of RNA interference (RNAi), a biological way to control gene expression, has revolutionised the field of biomedical research. Of the many applications of RNAi, perhaps its use for therapeutic purposes is the most promising. One group of diseases where the use of therapeutic RNAi is being actively explored is that of neurodegenerative disorders.* Aim. *To provide both the clinical neurologist and the basic researcher with an updated summary of the development of therapeutic RNAi for neurodegenerative diseases.* Development. *The technical progress made in the manipulation of RNAi in neurons and the recent advances in our knowledge of the pathogenesis of neurodegenerative processes have been valuable aids in designing therapeutic RNAi for both hereditary and idiopathic diseases. Several pre-clinical trials have been successfully completed in animal models, thus clearing the way towards the design of clinical trials in humans. Nevertheless, before reaching that point more experimental studies need to be carried out in animals to prove the effectiveness of this mode of therapy and, still more important, to be able to predict the possible side effects of this procedure in the human brain.* Conclusions. *Although it is still in the pre-clinical stages, the use of RNAi for therapeutic purposes in neurodegenerative diseases is producing some very promising results. The evolution of this field over the next few years may be critical for beginning its clinical application.* [REV NEUROL 2008; 47: 641-7]

Key words. Gene therapy. MicroRNA. Neurodegenerative diseases. RNA interference. RNAi. Viral vectors.