



**TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA**

Título: MicroARNs, una nueva aproximación terapéutica

Autor: Claudia del Amo Ibarro

Tutor: Manuel Rafael Ramírez Chamond.
Cotutora: Matilde Alique Aguilar

Curso:2016

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

(Segunda Página de Memoria del Trabajo Fin de Grado)

D/D^a MANUEL RAFAEL RAMÍREZ CHAMOND
Profesor del Departamento de **BIOLOGÍA DE SISTEMAS**
como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de
D/D^a CLAUDIA DEL AMO IBARRONDO

Titulado: **MICRO ARNs, UNA NUEVA APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA.**

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el/la mencionado/a alumno/a
bajo mi dirección y con esta fecha autorizo a su presentación y defensa pública

Alcalá de Henares .6 de **JULIO** de 20..16

Fdo.:



Índice

- I. Resumen / Abstract
- II. Palabras clave
- III. Introducción
 1. ¿Qué son los microARNs?
 2. Historia
 3. Biogénesis
 4. Funciones
- IV. Objetivos
- V. Materiales y métodos
- VI. Resultados. Discusión y conclusiones.
 1. MicroARNs como biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades.
 - 1.1 Cáncer
 - 1.2 Enfermedades cardiovasculares
 - 1.3 Diabetes Mellitus
 - 1.4 Hepatitis C
 2. MicroARNs como dianas farmacológicas en terapia génica.
 - 2.1 Modulación de la expresión de los miARNs circulantes.
 - 2.1.1 Silenciamiento de miARNs: Anti-miRs y esponjas de miARN.
 - 2.1.2 Restauración de la función de los miARNs: Imitadores de miARNs.
 - 2.2 Modificación de los moduladores de miARN para su utilización en terapia.
 - 2.3 Vehiculización de los moduladores de miARNs hacia los tejidos diana.
 3. Perspectivas de futuro.
 4. Conclusiones
- VII. Bibliografía

I. Resumen

Los microARNs son una familia de ARNs interferentes, endógenos y cortos que, como resultado de su unión a ARNs mensajeros diana, inhiben la expresión de genes, alterando la síntesis proteica. Los miARNs intervienen en diversas funciones del organismo como son el desarrollo embrionario, el metabolismo o la proliferación celular. Asimismo, la alteración en su expresión está involucrada en diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la hepatitis C. Sin embargo, actualmente, los miARNs se están estudiando como posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades provocadas por su desregulación en el organismo. Dentro de estas investigaciones, se están realizando estudios farmacológicos en los que se exploran diferentes técnicas de vectorización de los moduladores de miARNs para su utilización *in vivo*, ofreciendo resultados esperanzadores.

Abstract

MicroRNAs are a family of interference, endogenous and short RNAs which, as a result of their union to targeted messenger ARNs, they inhibit gene expression, altering protein synthesis. MiRNAs are involved in various body functions such as embryonic development, metabolism or cell proliferation. Likewise, the alteration in their expression is involved in various diseases such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes and hepatitis C. However, currently, miRNAs are being studied as possible therapeutic targets in the treatment of the diseases caused by their deregulation in the body. Within these investigations, pharmacological studies are being conducted in which different techniques of vectorization of miRNAs modulators for *in vivo* use, are being explored, offering promising results.

II. Palabras clave

MicroARN · Enfermedad · Expresión génica · Terapia · Vector

III. Introducción

1. ¿Qué son los microARNs?

La secuenciación del genoma humano ha demostrado que el genoma es muy rico en ARNs no codificantes, pero: ¿qué es el ARN?

El ARN es una macromolécula que interviene en la síntesis de proteínas y en el traslado de la información genética desde el ADN (1).

Existe una clase de ARNs cortos que son los llamados "microARNs" o "miARNs". Los miARNs son una familia de ARNs endógenos, no codificantes, que tienen una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) y cuya característica fundamental es su capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional (2).

2. Historia

Los miRNAs fueron descubiertos en 1993 por Lee, Feinbaum y Ambros en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. En estos organismos se descubrió que existía un par de ARNs cortos que regulaban las fases del desarrollo de las larvas (3).

Más tarde, este grupo de científicos junto con el grupo de Wightman y colaboradores se dieron cuenta de que esos pequeños ARNs poseían secuencias complementarias con múltiples sitios de la secuencia del ARN mensajero relacionado con el gen responsable del desarrollo larvario. Y determinaron que gracias a esta complementariedad de secuencias, se producía el progreso en el desarrollo de las larvas (4).

En un principio, se pensó que este modelo novedoso de regulación de la expresión génica era un fenómeno exclusivo de *C. elegans*. Sin embargo, años más tarde, se descubrieron más de 10.000 miARNs distintos en diversos organismos como virus, lombrices y primates, incluidos los humanos (3).

3. Biogénesis

La biogénesis de los miARN en animales es un proceso complejo que empieza en el núcleo, pasa a través de muchas modificaciones post-transcripcionales, y acaba en el citoplasma (3).

Como se muestra en la figura 1, la vía de maduración del miARN se inicia, con la transcripción en el **núcleo** del ADN mediante la ARN polimerasa II, generando un miARN primario (pri- miARN). El pri- miARN se caracteriza por una estructura en forma de horquilla de ARN, que es reconocida por una encima nuclear (ARNasa III) llamada **Drosha**, y por su cofactor DGCR8 (3).

Esta proteína trabaja dentro de un complejo de varias proteínas conocido como el Microprocesador. El Microprocesador se adhiere al pri- miARN para generar, una horquilla más pequeña. Éste es el precursor del miARN (pre-miRNA) (3).

El pre-miARN es exportado desde el núcleo al citoplasma vía Exportina-5, la cual es una proteína transportadora núcleo-citoplasmática dependiente de GTP (3).

En el **citoplasma** una segunda ARNasa tipo III, llamada **Dicer**, hace un par de cortes en el pre-miRNA generando miARNs cortos (22 nt) de doble cadena. Este miARN de doble cadena contiene tanto la hebra de miARN madura como su hebra complementaria (miARN*) (3).

Sólo una cadena simple y madura de miARN de las dos que formaban la doble cadena, se integrará en el complejo RISC (siglas en inglés de *RNA - induced silencing complex*), mientras que la otra se degradará, completándose, de esta

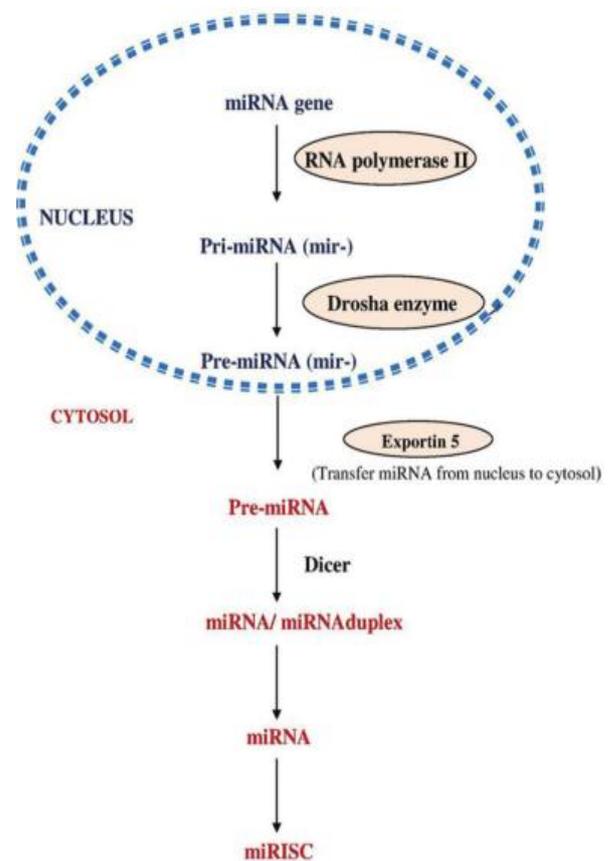


Fig1. Esquema representativo de los mecanismos de biogénesis de los miARNs (14)

forma, la biogénesis del miARN maduro (3). Por último, cabe decir que la cadena de miARN maduro recién formada permanecerá incorporada al complejo RISC, que se encuentra localizado en el citoplasma, desde el cual ejercerá su función de modulación de la expresión génica (5).

4. Funciones

Los miARNs se encuentran dentro del grupo de ARNs interferentes, cuya principal función es inhibir la expresión de determinados genes. Los miARNs llevan a cabo esta función a través del complejo miRISC, del cual forman parte. Guiado por la hebra de miARN maduro, el complejo miRISC se une al ARN mensajero diana, interfiriendo en la maquinaria de la traducción y, por consiguiente, alterando la síntesis de las proteínas (4).

El mecanismo por el cual un miARN ejerce su función depende del grado de complementariedad entre el miARN y su ARN mensajero (ARNm) diana. Por un lado, si la complementariedad entre ambas secuencias es total, los miARNs inducirán la degradación del ARNm diana. Sin embargo, si el emparejamiento entre las bases no es perfecto, como ocurre con la mayoría de los miARN de mamíferos, dichos miARNs inhibirán la traducción de los ARNm (5).

Se ha visto que las funciones de los microARNs no se limitan exclusivamente a la regulación de las fases del desarrollo embrionario, como se vio originalmente en *Caenorhabditis elegans* sino que además, mediante su unión a los ARN mensajeros son capaces de afectar a una amplia gama de procesos biológicos en los seres vivos. Igualmente, pueden estar involucrados en varias importantes enfermedades como el cáncer o las enfermedades cardíacas entre muchas otras, que desarrollaremos más profundamente a lo largo de este trabajo. (6).

IV. Objetivos

Un objetivo de este trabajo, es dar a conocer los miARNs y su capacidad para actuar como marcadores de diagnóstico de enfermedades.

Este texto tiene otro propósito que consiste en poner de manifiesto que los miARNs pueden ser herramientas terapéuticas de gran utilidad. En concreto, se desean presentar las distintas estrategias farmacológicas que se pueden perseguir para transportar de forma eficaz y eficiente los miARNs *in vivo*.

V. Materiales y métodos

Se ha realizado una búsqueda documental mediante dos vertientes, por un lado presencial y por otro lado on-line.

La búsqueda presencial ha consistido en la indagación de información específica sobre los miARNs en varios libros de texto relacionados con el tema de este trabajo, los cuales han sido facilitados por profesores de la universidad de Alcalá.

Para la realización de la búsqueda vía on-line, se ha utilizado la web de la biblioteca de la UAH (BUAH), la cual contiene un apartado llamado "Recursos-e" en el que se pueden encontrar diversas bases de datos en función de la materia de interés, siendo en este caso farmacia. Para realizar una investigación suficientemente exhaustiva, se han usado varias bases de datos, como son "PubMed", "Web of Science" y "Scopus". En dichas bases de datos, se ha seguido una estrategia de búsqueda en la cual se han usado, en primer lugar, los siguientes términos: "microRNA", "miRNA therapy" y "small RNA", utilizándose el operador OR para recuperar todos los sinónimos relacionados con este tema. Posteriormente, debido a la enorme cantidad de información que ha aparecido con dichos términos, utilizando el operador AND, se han añadido términos de búsqueda adicionales como "delivery", "human disease", "gene expression" y "vector", permitiendo acotar la búsqueda a una selecta variedad de publicaciones de gran interés.

Finalmente, se ha realizado una selección de las publicaciones que, por el tema que trataban, se adecuaban más a este trabajo, de aquellas más recientes y más citadas y de aquellas que se encontraban en revistas de mayor impacto. En cuanto al período que se ha abarcado, se ha realizado una revisión

histórica que engloba publicaciones desde el año 2004 hasta hoy y una revisión más exhaustiva que abarca publicaciones de los 5 últimos años.

VI. RESULTADOS. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

1. MicroARNs como biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades.

En la actualidad no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el que se altera la expresión de los microARNs. Como se ha descrito, los microARNs están involucrados en gran variedad de enfermedades. Concretamente, en este trabajo nos centraremos en el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la hepatitis C, ya que son patologías que tienen gran repercusión hoy en día, sobre todo en los países desarrollados (5).

1.1 Cáncer

En el cáncer, los miRNAs trabajan como moléculas reguladoras, pudiendo actuar, o bien como oncomirs, es decir miARNs inductores de cáncer. o por el contrario, como agentes supresores de tumores (5).

De acuerdo con este hecho, se ha demostrado que el perfil de expresión de dichas moléculas puede ser de utilidad para diagnosticar y pronosticar distintos tipos de neoplasias, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: MicroARNs más importantes asociados con ciertos tipos de neoplasias.

Tipos de neoplasia más destacados	Principales microARNs implicados
Leucemia linfocítica crónica (LLC)	miR-15 y miR-16 aparecen infraexpresados en la LLC (3).
Cáncer de pulmón	Las familias let - 7 y miR-34 se encuentran infraexpresados en cáncer de pulmón (7).

<p>Cáncer de pulmón</p>	<p>miR-203 y miR-145 se encuentran infraexpresados, lo cual es importante para el diagnóstico de esta enfermedad (8).</p>
<p>Cáncer de páncreas</p>	<p>La familia miR-34 (especialmente miR-34a) aparecen infraexpresados o ausentes, por lo que su ausencia es un factor de diagnóstico en este tipo de cáncer (2).</p> <p>miR-21 aparece sobreexpresado, por lo que su determinación puede ser clave para el diagnóstico del cáncer de páncreas y además, está asociado a un pronóstico desfavorable (9).</p>
<p>Cáncer de mama</p>	<p>miR-9 aparece sobreexpresado en células de cáncer de pecho y está asociado con un aumento de la motilidad celular y de la invasividad (3).</p> <p>miR-10b y miR-21 se encuentran sobreexpresados y están relacionados con el desarrollo de metástasis y con un pronóstico desfavorable (10).</p> <p>Un aumento en los niveles de expresión de miR-34a y de miR-122 durante la quimioterapia se asocia con una buena respuesta al tratamiento (10).</p>
<p>Cáncer de hígado</p>	<p>miR-122 se encuentra infraexpresado o ausente, lo cual puede inducir al diagnóstico de esta enfermedad (11).</p> <p>miR- 145 se encuentra infraexpresado y este hecho se relaciona con un mal pronóstico (11).</p>

Cáncer de hígado

Una disminución en la expresión de **miR-99a** en carcinoma hepatocelular está correlacionada con un mal pronóstico para los pacientes, ya que actúa como supresor de la proliferación celular (12).

1.2 Enfermedades cardiovasculares

En el corazón humano se han identificado un conjunto de miARNs que están sobreexpresados y que por lo tanto, es probable, que desempeñen un papel esencial tanto en el mantenimiento de una actividad cardíaca normal como en la inducción de enfermedad. Entre estos miARNs se incluyen miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143, miR-208 y la familia de miARNs let-7 (13).

Algunos de ellos, aparecen descritos en la Tabla 2.

Tabla 2: Patologías cardíacas en las que intervienen aquellos microARNs más relevantes.

Patologías cardíacas más relevantes	Principales microARNs implicados
Lesión cardíaca	miR-15 aparece sobreexpresado cuando el corazón se encuentra dañado por isquemia (14).
Remodelado cardíaco	Los niveles de expresión de miR-133 y de miR-1 son inversamente proporcionales al grado de hipertrofia en el músculo cardíaco (13).
Arritmias ventriculares	El miR-1 se encuentra infraexpresado en pacientes con arritmias ventriculares (13).
Hipertensión	El miR-145 se encuentra sobreexpresado en los pacientes hipertensos (13).

Aterosclerosis	<p>La disminución de los niveles de miR126-5p induce la agregación plaquetaria (13).</p> <p>La sobreexpresión de miR-155 favorece la infiltración de células inflamatorias en el endotelio vascular (13).</p> <p>La disminución en los niveles de expresión de miR-33 se asocia con un aumento en los niveles de HDL en sangre, actuando como mecanismo de defensa contra la aterosclerosis (13).</p>
Insuficiencia cardiaca	Elevados niveles de miR-25 aumentan el riesgo de padecer insuficiencia cardiaca. Por el contrario, cuando este miARN se encuentra infraexpresado, constituye un factor de buen pronostico (13) .

1.3 Diabetes Mellitus

Varios estudios han demostrado que los miARNs son necesarios para el desarrollo adecuado de los islotes pancreáticos y están involucrados en la utilización de la insulina por parte del organismo (15). Concretamente, hay dos miARNs que abundan en las células pancreáticas: miR-375 y miR-9 (Tabla 3).

Tabla 3: Algunos microARNs involucrados en determinados procesos relacionados con la diabetes.

Circunstancias importantes relacionadas con la diabetes	Principales microARNs implicados
Exocitosis de la insulina	La sobreexpresión de miR-375 y de miR-9 provoca una reducción en la exocitosis de la

	insulina a sangre (15).
Síntesis de la insulina	La sobreexpresión de miR-375 se asocia con un detrimento en la síntesis de la insulina (15)
Captación de glucosa por la insulina	miR-375 se ha relacionado con la disminución en los niveles de la proteína responsable de la captación de glucosa por parte de la insulina (16).
Número de células β pancreáticas	La sobreexpresión de miR-375 provoca una disminución en el número de células pancreáticas del 25% y en la viabilidad celular de un 20% (16).

1.4 Hepatitis C

El miARN miR-122 es el miARN más comúnmente encontrado en el hígado adulto, y juega un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación y homeostasis del hígado así como en sus funciones entre las cuales se encuentran la síntesis y metabolismo del colesterol (14). Sin embargo este mismo miARN juega un papel fundamental en la hepatitis C (Tabla 4).

Tabla 4: Función del miR-122 en la hepatitis C.

Papel en la hepatitis C	MicroARN implicado
Proliferación viral y mantenimiento de la infección en el hepatocito.	El principal miARN implicado en la replicación del virus de la hepatitis C es el miR-122 ya que actúa uniéndose al genoma del virus, e incrementa la traducción de proteínas virales y por tanto favorece la síntesis de virus y su permanencia en el hepatocito (14).

2. MicroARNs como dianas farmacológicas en terapia génica.

Como se ha demostrado, cuando la expresión de los miARNs se encuentra alterada, constituye una causa de aparición de enfermedades. Sin embargo, en la actualidad, es posible manipular la expresión de los miARNs que se encuentran alterados mediante diversas técnicas terapéuticas, las cuales se desarrollarán a continuación.

2.1 Modulación de la expresión de los miARNs circulantes.

Hoy por hoy, existen dos estrategias principales para modular la actividad de los miARNs. Estas dos estrategias dependen de si se requiere disminuir la expresión del miARN diana o de si por el contrario, es necesario restaurar la función que ha perdido dicho miARN. (14)

2.1.1 Silenciamiento de miARNs: Anti-miRs y esponjas de miARN.

Para silenciar la expresión de miARNs endógenos, existen dos herramientas terapéuticas diferentes. Una de ellas son las esponjas de miARNs y la otra son los oligonucleótidos antisentido.

Las esponjas de miARN son moléculas de ARN que contienen múltiples sitios de unión al miARN de interés. Este hecho les permite inhibir a todos aquellos miARNs que tengan una secuencia complementaria a esos sitios de unión, siendo capaces de, incluso, silenciar la función de una familia completa de miARNs (17).

Los oligonucleótidos antisentido, también conocidos como "anti-miRs", "antagomirs" o "blockmirs", son oligonucleótidos de ARN perfectamente complementarios a la secuencia del miARN diana, lo que les permite secuestrar de forma altamente específica a los miARNs de interés, provocando su inhibición funcional (18).

El primer paso para desarrollar este tipo de estrategias consiste en averiguar una serie de datos cruciales como son: identificar la molécula de ARN que actuará como antimir, conocer su mecanismo de acción, determinar su aplicabilidad como ARN de interferencia y dilucidar si es viable su utilización *in*

vivo. Una vez que se disponga de esta información, será posible usarlos como herramientas terapéuticas (14).

El proceso de descubrimiento y desarrollo de oligonucleótidos antisentido y de esponjas de miARN para su posterior utilización en terapia, es similar al utilizado para un fármaco convencional. Las etapas a seguir serían las siguientes:

1. Identificación del perfil de expresión del miARN diana usando técnicas de predicción bioinformática y de caracterización.
2. Comprobación de que el miARN caracterizado es efectivamente el miARN de interés mediante estudios *in vitro* y ensayos en animales de pérdida y ganancia de función.
3. Análisis farmacológico mediante estudios *in vivo* de administración de los anti-miR o de las esponjas de miARN y estudios de farmacocinética, farmacodinamia y de toxicidad. Estos estudios se realizan con el objetivo de determinar el nivel óptimo de inhibición para un miARN dado.
4. Ensayos clínicos que permitan la evaluación de la eficacia y la seguridad del anti-miR o de la esponja de miARN que se desea utilizar en terapia (14).

2.1.2 Restauración de la función de los miARNs: Imitadores de miARNs.

Actualmente existe un método que permite restaurar la función de aquellos miARNs que se encuentran infraexpresados. Este método se basa en usar miARNs sintéticos de doble hebra, llamados "imitadores de miARN" o "miméticos de miARN", los cuales contienen la misma secuencia de nucleótidos que el miARN maduro endógeno, lo cual les confiere la capacidad de mimetizar la función de los miARNs diana que se encuentran infraexpresados y cuya función se ha perdido. En teoría, cualquier molécula de ARN de cadena simple que contuviera la misma secuencia que el miARN maduro, sería capaz de actuar como imitador de miARN. Sin embargo, se ha visto que los imitadores de miARN formados por una doble cadena poseen entre 100 y 1000 veces más potencia que los imitadores de miARN formados

por una sola cadena. En estas moléculas de doble cadena, hay una "hebra guía" que tiene una secuencia idéntica a la del miARN diana y una "hebra pasajera" que, en cambio, posee la secuencia complementaria a la de dicho miARN (19).

Existen diversos estudios en los que se han utilizado imitadores de miARN. En uno de ellos, se realizó la administración de imitadores de miR-99a mediante inyección intratumoral, dando lugar a una inhibición significativa del crecimiento del tumor en ratones con carcinoma hepatocelular (19).

2.2 Modificación de los moduladores de miARN para su utilización en terapia.

A la hora de utilizar un anti-miR en terapia es necesario hacer frente a dos problemas principales:

Por un lado, los mecanismos de recepción celular y de distribución de los anti-miRs son poco conocidos. Por ello, se realizaron estudios de administración de anti-miRs en ratón. Dichos estudios dieron como resultado la inhibición funcional de los miARNs diana en el tejido de interés. Sin embargo, en estos estudios se reportó la aparición de una serie de efectos indeseados que se basaban en la acumulación de estos anti-miRs en órganos no diana como riñón e hígado y en tejidos periféricos como corazón, pulmón, bazo y medula ósea (2).

Por otro lado, también se comprobó que los niveles de expresión de los miARNs varían mucho dependiendo del tipo de célula y tejido, así como del tipo de enfermedad (2).

Por todo ello se concluyó que es necesario modificar la estructura química de los oligonucleótidos antisentido con el objetivo de mejorar su afinidad de unión al miARN diana, su bioestabilidad, sus propiedades farmacológicas y su resistencia frente a nucleasas (2).

Las modificaciones químicas que se pueden realizar en dichos anti-miRs incluyen la introducción de enlaces fósforo-azufre en la molécula, la

introducción de un O-metilo o un O-metoxietilo en la posición 2' del anillo de ribosa, la formación de nucleótidos cerrados (LNA, locked nucleic acid), o la formación de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (19).

La introducción de enlaces fósforo-azufre, consiste en la sustitución de uno de los oxígenos del grupo fosfato por un azufre. Esta modificación produce un aumento de la resistencia frente a nucleasas, permitiendo la administración por vía parenteral. Sin embargo esta modificación incluye algunas limitaciones como son, que los anti-miRs modificados tendrán una vida media relativamente corta *in vivo*, una baja afinidad por los ARNs mensajeros y una baja especificidad a la hora de inhibir el crecimiento celular, las cuales, por el momento, dificultan la aplicación de esta técnica en terapia (19).

Para solventar dichas limitaciones, es posible introducir un O-metilo o un O-metoxietilo en posición 2' en estos anti-miRs modificados, aumentando la estabilidad de la molécula y protegiéndola frente a la acción de nucleasas, lo que disminuiría la frecuencia de administración y evitaría la necesidad de infusiones continuas (19).

Otra estrategia se basa en la formación de nucleótidos cerrados (LNAs) en la molécula moduladora de miARN. Los LNAs son nucleótidos con la ribosa parcialmente bloqueada mediante un puente entre el oxígeno en posición 2' y el carbono en posición 4' (19).

Los ácidos nucleicos peptídicos son oligonucleótidos sin carga en los que el enlace fosfodiéster de la ribosa del modulador de miARN se ha sustituido por una estructura quiral consistente en unidades de N-(2-aminoetil)-glicina. Los PNAs exhiben una alta especificidad y estabilidad y no ofrecen señales de toxicidad. Asimismo, los PNAs no suelen requerir el transporte mediante vectores para ser administrados debido a su ausencia de carga. En su lugar, una técnica muy usada consiste en unir los PNAs a péptidos penetrantes de células para mejorar su llegada a los tejidos diana. Existe un estudio, en el que se utilizaron PNAs de anti-miR155 *in vitro* e *in vivo* en ratones, dando lugar a la inhibición de miR-155 con una alta especificidad. Sin embargo, se requirieron altas dosis de este fármaco para obtener una buena eficiencia y la vía sistémica supone un reto para la administración de esta terapia (19).

Por su parte, en los imitadores de miARN también constituye una buena estrategia introducir modificaciones químicas. Una importante modificación a realizar sobre estos moduladores consiste en su conjugación con moléculas de colesterol, lo que permite mejorar su captación por parte de las células. Sin embargo, existe una serie de problemas que hay que afrontar, antes de poder utilizar esta técnica en terapia (2).

Por una parte, debido a que el complejo miRISC necesita reconocer la hebra guía del imitador de miARN, las modificaciones químicas que se pueden introducir en la misma son limitadas. Por ello, la mayoría de modificaciones realizadas sobre la molécula van a parar a la hebra pasajera, en lugar de realizarse sobre la hebra guía. Además, hay que tener en cuenta que los imitadores de miARN pueden inducir una respuesta inmune inespecífica a través del interferón (2).

Otro reto al que hay que hacer frente, consiste en restaurar de forma específica la función del miARN que se encuentra infraexpresado a la vez que se previene su llegada a tejidos no diana. Este hecho provocaría la inducción de niveles suprafisiológicos de aquellos miARNs que no se encuentran alterados, dando como resultado la aparición de efectos no deseados para el paciente. Por ello, va a ser crucial la liberación de los imitadores de miARN hacia la célula o tejido apropiado. Con relación a este hecho, se ha reportado satisfactoriamente en varios estudios el uso de vectores que permiten conducir la expresión del imitador de miARN específicamente hacia el órgano donde el miARN diana se encuentra infraexpresado (2).

2.3 Vehiculización de los moduladores de miARNs hacia los tejidos diana:

A consecuencia de lo anterior, el reto principal para el desarrollo de terapias basadas en miARNs es conseguir que la liberación *in vivo* de los moduladores de miARNs, se realice con eficacia y seguridad (2). Por ello, se han desarrollado técnicas que permiten liberar tanto imitadores de miARNs como antimirRs mediante vectores. Estos transportadores ofrecen diversas ventajas

terapéuticas frente a aquellos moduladores de miARNs que no se encuentran incluidos en vectores. Dichas ventajas son una mejor localización de los miARNs diana, una menor inmunogenicidad y la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (20).

Los imitadores de miARNs y los oligonucleótidos antisentido pueden ser vehiculizados en determinadas moléculas como son exosomas, nanopartículas liposomales, microesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) y dendrímeros. Pero además, éstos pueden ser transportados mediante vectores víricos (19).

Aunque los vectores víricos han demostrado una buena eficacia en la liberación sistémica de moduladores de miARN en distintos ensayos clínicos y los perfiles de seguridad observados son hasta la fecha alentadores (36), los vectores no víricos poseen ventajas considerables sobre los víricos debido a que puede controlarse su composición molecular, son sencillos de fabricar, de modificar y de analizar, son capaces de transportar moléculas de distintos tamaños, y tienen una inmunogenicidad relativamente baja. Por el contrario, los vectores víricos presentan una mayor eficiencia en el transporte de moléculas frente a los vectores no víricos (19).

Las técnicas disponibles en el momento actual para la Vehiculización de los moduladores de miARNs se desarrollan a continuación:

Vectores víricos: los virus que mejores resultados han proporcionado son los virus adeno-asociados (AAV que son las siglas en inglés). Los virus adeno-asociados son virus ADN de cadena simple, desprovistos de envoltura, que pertenecen a la familia *Parvoviridae*. Tienen muy buen perfil de seguridad ya que inducen una muy leve respuesta inflamatoria y no existen evidencias de que produzcan toxicidad. Además, la existencia de distintos serotipos de virus adeno-asociados permite su actuación en una amplia variedad de tejidos y células (21).

Actualmente, se está investigando el uso de vectores víricos en varios ensayos clínicos. Por ahora se conocen los resultados de un estudio realizado en ratones con atrofia muscular bulboespinal, en los cuales se demostró que

existe un miARN, el miR-196a, el cual se encarga de regular la expresión del gen responsable de dicha enfermedad. A los ratones, se les administraron por vía intramuscular, imitadores del miR-196a encapsulados en el interior de vectores adeno-asociados. En dicho estudio, se comprobó que gracias a estos vectores, el imitador era transportado eficientemente desde el músculo hasta las neuronas motoras de la medula espinal, en cuyo citoplasma fue capaz de ejercer su función. Como resultado, se produjo una disminución en la atrofia muscular y una mejora notable del deterioro motor en los ratones que fueron tratados frente a los que no lo fueron (22).

Exosomas: los exosomas son vesículas membranosas pequeñas de origen endocítico que son liberadas por las células al ambiente extracelular. Dichas vesículas son capaces de mediar la comunicación entre células y de propiciar la transferencia de los miARNs hacia el interior de las mismas. Concretamente, los exosomas de mastocito humano contienen miARNs que pueden ser liberados al interior de otras células, manteniendo la capacidad de ser funcionales en esta nueva localización (3).

La habilidad de los exosomas para liberar los miARNs, y por tanto, también los moduladores de miARNs, en las células a una cierta distancia, como por ejemplo desde la circulación sistémica, les convierte en candidatos ideales para actuar como vectores en terapia génica. Además, los exosomas no tienen carácter antigénico, lo que les confiere una ventaja inmunológica considerable frente a la liberación de miARNs mediante vectores virales (23).

Existe un estudio en el que se comprobó que es posible la inclusión de miARNs exógenos en el interior de exosomas. En este estudio se demostró que los virus oncogénicos son capaces de utilizar a los exosomas como vectores para transportar sus miARNs exógenos hasta otras células no infectadas, consiguiendo aumentar su propagación (24).

Sin embargo, para poder utilizar los exosomas como herramienta en terapia génica, se requieren investigaciones más profundas (24).

Nanopartículas liposomales: la encapsulación liposomal ha demostrado facilitar la recepción celular de los moduladores de miARNs y aumentar la

protección de los mismos frente a la degradación. Sin embargo, se ha visto que los lípidos cargados positivamente pueden inducir toxicidades dosis dependientes y una respuesta inmune mediada por interferón. Para evitar estos efectos secundarios, se ha explorado la posibilidad de sustituir dicha formulación lipídica por una emulsión neutra de lípidos (NLE -*neutral lipid emulsion*-) que es aniónica a pH fisiológico, lo cual previene interacciones no deseadas con las cargas negativas de las membranas celulares del endotelio y de otros tejidos. Sin embargo, a su vez, poseen la ventaja de que cuando dichos lípidos llegan al tumor, donde el pH tiende a ser más bajo, los lípidos se vuelven catiónicos, lo cual permite una mejor recepción de los miARNs por parte de las células tumorales (2).

Los liposomas parecen dar buenos resultados en las células de pulmón e hígado al ser administrados por vía intravenosa, ya que estos dos órganos actúan como filtros naturales reteniendo dichos vectores (25).

Concretamente, existe un estudio en el que se investigó el tratamiento del cáncer de pulmón en modelos de ratón utilizando emulsiones lipídicas neutras para la administración sistémica de imitadores sintéticos de miR-34a y let-7, observándose una disminución del 60% del área del tumor con respecto al tratamiento control. Además, no hubo indicios de que se activara la respuesta inmune, lo que sugiere que esta estrategia fue bien tolerada. (2)

En el tratamiento del cáncer de páncreas también se ha buscado actuar contra el miR-34a, el cual se encuentra infraexpresado en la mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas. En este caso, se sintetizaron nanopartículas liposomales neutras preparadas mediante la mezcla de tensioactivos, colesterol y otros productos lipídicos, que transportaban los imitadores de miR-34a hacia células cancerosas de ratón demostrando tener una eficacia terapéutica significativa en la restauración de la expresión del miR-34a y además, con ausencia de toxicidad.(26)

Microesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico): estas microesferas, también llamadas "partículas PLGA" son una familia de polímeros insolubles en agua muy utilizados en medicina en los últimos cincuenta años. Éstas son capaces de superar varias limitaciones que presenta la terapia con miARNs

debido a que pueden proteger a los ácidos nucleicos de la degradación y permiten la introducción de múltiples modificaciones con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacológicas. Existen varios estudios en los que se están revelando que estas microesferas poseen un gran potencial. En uno de ellos se usaron las partículas PLGA para transportar PNAs del antimiR-155 por vía sistémica en ratones con tumor de células progenitoras B y se comprobó que gracias a la utilización de este vector, aumentó la eficiencia en el transporte y mejoró el efecto terapéutico conseguido (19).

Dendrímeros: los dendrímeros son estructuras poliméricas que, entre otras características, poseen una gran versatilidad de formulación y la capacidad de modificar su tamaño y forma. Por ello son muy útiles para transportar fármacos u otras moléculas (27).

Actualmente, no se conocen muchas aplicaciones en las que se puedan usar dendrímeros para transportar miARNs. Sin embargo, una de ellas se ha investigado en un estudio en el que se utilizaban los dendrímeros para transportar antimiR-21 con 5-fluorouracilo hacia células de glioblastoma *in vitro*. Los resultados pusieron de manifiesto un aumento de la apoptosis y una menor migración del tumor en el cultivo de células tratado con ambas sustancias frente al cultivo tratado únicamente con 5-fluorouracilo. Esto sugiere que los dendrímeros son capaces de unirse al miARN diana y de favorecer la entrada de los moduladores de miARN y de otros fármacos en las células (19).

Polímeros de polietilenimina (PEI): los polímeros de polietilenimina son polímeros lineales o ramificados que se encuentran parcialmente protonados bajo condiciones fisiológicas, permitiendo de esta forma, la formación de complejos con ácidos nucleicos como los miARNs. Existe un estudio en el que se puso en práctica la terapia de remplazo de miARNs en ratones con carcinoma de colon. Mediante inyecciones intratumorales se les administraron dos miARNs que se encuentran infraexpresados en este tipo de tumor: miR-145 y el miR-33a, los cuales iban conjugados con polímeros de polietilenimina. Los resultados de este estudio demostraron que los complejos de miARN/polietilenimina poseen la capacidad de disminuir la proliferación y de aumentar la apoptosis en las células tumorales con una alta especificidad, ya

que no se detectaron efectos adversos significativos en los ratones durante el ensayo. Estos resultados hacen pensar en que esta técnica puede abordar no solo la administración local mediante inyección intratumoral sino además, la liberación sistémica de los moduladores de miARNs (28).

Atelocolágeno: existe un estudio en el que se trató con terapia de reemplazo a ratones con cáncer de próstata metastatizado en hueso. Se les administró de forma sistémica imitadores de miR-16 conjugados con atelocolágeno, ya que dicho miARN es el que se encuentra principalmente infraexpresado en este tipo de cáncer. Se demostró que el atelocolágeno facilita la acumulación de la cantidad suficiente de miARN como para que sean capaces de ejercer efecto en el tejido diana, hecho que fue confirmado gracias a la marcada inhibición del crecimiento del tumor que mostraron los ratones tratados. Además de demostrar la capacidad del atelocolágeno para liberar eficientemente los moduladores de miARN en los tumores metastásicos, este estudio también mostró que la liberación de estos complejos se efectuaba de forma altamente específica ya que no se observaron efectos secundarios notables en los ratones tratados (29).

3. Perspectivas de futuro

Los miARNs representan un instrumento novedoso y atractivo capaz de manipular las funciones corporales. Consecuentemente, ha habido un aumento en el número de patentes en este campo en los últimos años (14).

A pesar de ello, pocos moduladores de miARNs han conseguido llegar a la fase I de un ensayo clínico. Concretamente, existe un imitador de miR-34, encapsulado en partículas liposomales, desarrollado bajo el nombre de MRX34 por la compañía biofarmacéutica *Mirna Therapeutics, Inc.* que está siendo estudiado en un ensayo clínico para el tratamiento de pacientes con cáncer de hígado. Otro modulador que ha llegado hasta esta fase de investigación es un oligonucleótido antisentido llamado Miravirsen o SPC3649 desarrollado por Santaris Pharma. Dicho anti-miR actúa contra el miR-122, y ha sido evaluado para utilizarse en el tratamiento de la hepatitis C (19).

Sin embargo, es de esperar, que con los avances en la investigación y en el desarrollo de los miARNs, así como con el aumento en el número de patentes solicitadas y en el interés puesto por parte de las compañías biofarmacéutica se consiga la disponibilidad terapéutica de los miARNs en el mercado en los próximos años para el tratamiento de distintas enfermedades (Tabla 5) (14).

Tabla 5: Estado actual en el que se encuentran los estudios basados en terapia con miARNs (14)

Company	Targeted miRNA	Diseases	Technology/chemistry	Mechanism/effect	Stage
Regulus Therapeutics	miR-122	HCV infection	Anti-miR	Block HCV infection	Preclinical
	miR-10b	Glioblastoma	Anti-miR	Reduces proliferation by blocking cell cycle progression and triggering cell death	Preclinical
	miR-221	HCC	Anti-miR	Delayed tumor progression resulting in a survival rate	Preclinical
	miR-21	Renal fibrosis	Anti-miR	Reducing the expression of extracellular matrix proteins	Preclinical
	miR-33	Atherosclerosis	Anti-miR	Regulation of cholesterol and fatty acid homeostasis via decrease in very LDL triglycerides and an increase in high-density lipoprotein	Completed preclinical
Santaris Pharma Mima Therapeutics	miR-122	HCV	Anti-miR	Prolonged mean reductions in viral plasma RNA levels from baseline	Phase IIa
	miR-34	Primary liver cancer or solid cancers with liver involvement	mimic	Reduction in the expression of oncogenes, tumor regression, enhanced the survival, and inhibited the growth of other nonhepatic tumors	Phase I
	miR-155	Hematological malignancies	Anti-miR	Restores normal function and reduces the aberrant cell proliferation	Completed preclinical
miRagen Therapeutics	miR-92	Peripheral artery disease	Anti-miR	Enhances blood vessel growth and improves functional recovery of damaged tissue	Preclinical
	miR-15	Myocardial infarction	Anti-miR	Reduces heart muscle cell death and promotes heart muscle cell regeneration	Preclinical

miRNA=MicroRNAs, HCV=Hepatitis C virus, HCC=Hepatocellular carcinoma, LDL=Low-density lipoprotein

4. Conclusiones

1. Los microARNs son moléculas que intervienen en gran cantidad de procesos fisiológicos, pero también en diversas enfermedades debido a su capacidad de regular la expresión génica, actuando sobre los ARN mensajeros.
2. Los miARNs pueden ser de utilidad como biomarcadores de diagnóstico. En función de que se encuentren infra o sobreexpresados se podrá tener una idea, no sólo de la presencia o ausencia de enfermedad sino también del pronóstico de la misma.
3. Los miARNs pueden usarse como herramienta terapéutica. Existen dos formas de terapia: (i) el uso de anti-miRs o de esponjas para lograr el silenciamiento de los miARNs y (ii) la utilización de miméticos de miARN para

restaurar su función. Normalmente, para que puedan ser utilizados *in vivo* con eficacia, requieren que su estructura sea modificada químicamente.

4. Para conseguir que los moduladores de miARNs lleguen al tejido diana y produzcan los menores efectos secundarios posibles y por tanto, mejorar su aplicabilidad terapéutica, constituye una buena estrategia, utilizar vectores que los transporten específicamente al sitio de interés. Dichos vectores pueden ser virales o no virales, poseyendo cada uno sus respectivas ventajas terapéuticas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Pizzorusso T, Cellerino A, Bally-Cuif L. Regulatory RNAs in the Nervous System. *Frontiers Media SA*; 2015. 192-209.
2. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med*. 2014;6(7):851-64.
3. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem*. 2011;67(1):129-39.
4. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol*. 2014;51(4):759-74.
5. Bandrés E, García-Foncillas J. Implicaciones clínicas de la investigación clínica. Micro-ARN y cáncer. *GH Continuada*. 2009;8(5):248-53.
6. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(8):522-31.
7. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, et al. Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. *Mol Ther*. 2011;19(6):1116-22.
8. Hu H, Xu Z, Li C, Xu C, Lei Z, Zhang H-T, et al. MiR-145 and miR-203 represses TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and invasion by inhibiting SMAD3 in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2016;97:87-94.
9. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol Ther*. 2013;21(5):986-94.
10. Casey M-C, Sweeney KJ, Brown JAL, Kerin MJ. Exploring circulating micro-RNA in the neoadjuvant treatment of breast cancer. *Int J Cancer*. 2016;139(1):12-22.

11. Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. Micro-ARN (miARN) et cancer: le cas des tumeurs hépatocellulaires. *médecine/sciences*. 2009;25(5):467-72.
12. Li D, Liu X, Lin L, Hou J, Li N, Wang C, et al. MicroRNA-99a Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth and Correlates with Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36677-85.
13. Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101(12):921-8.
14. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*. 2016;7(2):68-74.
15. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res*. 2011;157(4):253-64.
16. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008;57(10):2708-17.
17. Gil GL, Rodríguez ABA, Bayonas AC, Peña FA de la. CircRNAs: esponjas moleculares de microRNAs, ¿futuro terapéutico en cáncer? *Eubacteria*. 2013;(32):2-12.
18. Tay FC, Lim JK, Zhu H, Hin LC, Wang S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:117-27.
19. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release*. 2013;172(3):962-74.
20. Cheng G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:75-93.
21. Aalbers CJ, Tak PP, Vervoordeldonk MJ. Advancements in adeno-associated viral gene therapy approaches: exploring a new horizon. *F1000 Med Rep [Internet]*. 2011 [citado 4 de julio de 2016];3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169911/>
22. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang Y-M, Huang Z, et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*. 2012;18(7):1136-41.

23. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
24. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics.* 2015;13(1):17-24.
25. Rozalén J, Ceña V, Jordán J. Terapia génica. Vectores de expresión. *Offarm.* 2003;22(8):102-8.
26. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. Restitution of Tumor Suppressor MicroRNAs Using a Systemic Nanovector Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(8):1470-80.
27. Wu L, Ficker M, Christensen JB, Trohopoulos PN, Moghimi SM. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. *Bioconjugate Chem.* 2015;26(7):1198-211.
28. Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Gruenweller A, Hartmann RK, Aigner A. MicroRNA Replacement Therapy for miR-145 and miR-33a Is Efficacious in a Model of Colon Carcinoma. *Cancer Res.* 2011;71(15):5214-24.
29. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi R, Yamamoto Y, Kosaka N, et al. Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple Cell-cycle Genes. *Mol Ther.* 2010;18(1):181-7.