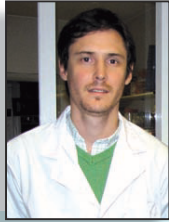


# Metabolismo lipídico, micro RNAs y enfermedad cardiovascular

– nuevas terapias génicas basadas en interferencia de ARN –



Dr. Nicolás Dell'Oca\*, Dr. Mario Stoll\*\*

\*Asistente Médico del Programa Genyco. Área de Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Asistente Departamento de Genética-LOBBM. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

\*\*Director del Programa Genyco. Área de Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Montevideo. Uruguay



**Resumen:** El descubrimiento de los microRNAs está impactando la comprensión de la regulación del metabolismo lipídico y especialmente su modificación terapéutica. Los nuevos medicamentos ya están en plaza.

El metabolismo lipídico está regulado de manera fina por múltiples micro RNAs que además juegan un papel fundamental en el inicio y la progresión de la aterosclerosis.

Los micro RNAs son moléculas de ARNs doble cadena pequeñas de aproximadamente 22 nt. de largo que actúan como reguladores post transcripcionales de la expresión génica. Pueden regular al mismo tiempo muchos blancos a la vez e incluso vías metabólicas complejas en su totalidad, lo que los convierte en grandes candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos. En este sentido ya están en vías de desarrollo distintas terapias génicas con inhibidores o análogos de miRNA para muchas enfermedades.

El campo de la farmacología dio un gran salto con la aprobación por parte de la FDA de la primera terapia génica usando un RNA anti sentido contra el gen de la Apolipoproteína B. Se trata del Mipomersen que ya está disponible en nuestro país para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar.

**Palabras claves:** micro RNAs, metabolismo lipídico, aterosclerosis, terapias génicas, mipomersen.

**Abstract:** The discovery of the microRNAs is changing the understanding of the regulation of lipid metabolism and particularly it's therapeutic. We already have these new drugs.

Lipid metabolism is regulated by multiple micro RNAs, which also play a critical role in the initiation and progression of atherosclerosis.

The micro RNAs are double-stranded RNA molecules of about 22 nt. in length that act as regulators of gene expression after transcription. They can regulate many targets at the same time and even complex metabolic pathways, which makes them great candidates for the development of new drugs. In this sense, are under development, some gene therapies miRNA inhibitors or analogs for many diseases.

Recently, pharmacology generated a great leap with the approval by the FDA of the first gene therapy using an antisense RNA against Apolipoprotein B gene. We are talking about Mipomersen, which is already available in our country for the treatment of familial hypercholesterolemia.

**Keywords:** microRNAs, lipid metabolism, atherosclerosis, gene therapies, mipomersen

## Introducción

El hallazgo de los micro ARNs reguladores tiene poco tiempo. Estos son moléculas de ARN doble cadena de pequeño tamaño que unen a los ARN mensajeros (ARNm) impidiendo la síntesis de proteínas. Los descubrimientos del primer micro ARN en 1993 (1) y

E-mail: ndelloca@cardiosalud.org

el mecanismo de la interferencia de ARN en 1998 por Andrew Fire y Craig Mello(2) permitieron conocer un gran número de ARNs pequeños no codificantes (ncRNAs por la sigla en inglés). De esta gran población, los principales ncRNAs son micro RNAs (miRNA), piwiRNAs (piRNA) y ARNs pequeños de interferencia (siRNAs del inglés *small interference RNAs*). Estos juegan un papel fundamental en la regulación post transcripcional de la expresión génica y participan de

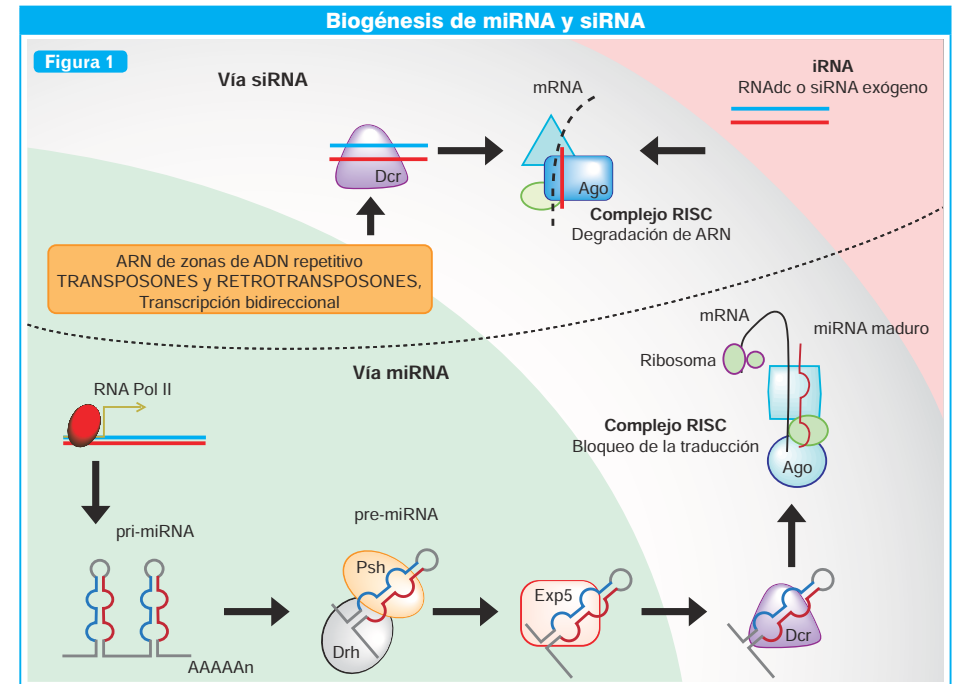
la regulación de procesos importantes como diferenciación celular, desarrollo, respuesta inmune e integridad del genoma.

Si bien la biogénesis y el mecanismo de acción de cada una de estas moléculas es algo diferente, en estas vías de regulación siempre participan enzimas de la familia llamada Argonauta (3). Estas proteínas se asocian al microRNA y forman complejos ARN-proteína llamados RISC (RNA-Induced Silencing Complexes: complejos de silenciamiento inducidos por ARN). Los complejos RISC usan los microRNAs como guía para silenciar de forma específica los ARN mensajeros que contienen una secuencia complementaria al miRNA maduro, induciendo la degradación de los mensajeros o reprimiendo su traducción. En este artículo nos centraremos en las vías miRNAs y siRNA, las cuales permiten el mecanismo denominado interferencia de ARN (ARNi).

Los miRNA están conservados prácticamente en todas las especies, lo que habla de su importancia como reguladores post transcripcionales de la expresión génica. El miRNA maduro consiste en un ARN doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) de unos 22 nucleótidos

(nt) aproximadamente. Después de un proceso de maduración y de su llegada al citoplasma, el miRNA maduro es cargado dentro del complejo RISC (Ver Figura 1), que se encarga de unir al miRNA con su gen blanco. Solo una de las hebras del miRNA maduro (*hebra guía*) participa de la unión con el blanco, mientras que la otra hebra (*hebra pasajera*) es descartada. Una vez que reconocen su blanco mediante apareamiento imperfecto, se produce un bloqueo principalmente a nivel de la traducción de proteínas (4). El hecho de que solo una pequeña región del miRNA (*llamada región semilla*) sea la encargada del reconocimiento de su blanco permite que un miRNA pueda unirse y regular muchos genes a la vez.

Los siRNAs actúan de manera muy similar a los miRNAs. Se generan a partir de secuencias endógenas (*transposones, secuencias repetidas, secuencias antisentido*), o esta vía puede activarse al introducir un ARN<sub>dc</sub> externo lo que se conoce como interferencia de ARN. Una vez generados los siRNAs son cargados en el complejo RISC con su propia Argonauta, se unen con homología completa a su blanco e inducen la de-



Esquema de una célula eucariota, el núcleo en verde, en gris el citoplasma y en rosado el exterior celular. Psh: Enzima Pasha; Drh: enzima Drosha; Exp5: Exportina 5; Dcr: Enzima Dicer; Ago: enzima Argonauta.

gradación endonucleolítica del mRNA, que inhibe la expresión del gen.

Los miRNAs regulan procesos importantes en humanos y uno de los mejor conocidos hasta ahora es la regulación del metabolismo lipídico y su influencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares<sup>(5,6,7)</sup>.

Esto ha generado una rápida exploración de nuevas drogas basadas en este principio de interferencia con micro RNAs sintéticos que están revolucionando el campo de la medicina. El **mipomersen sódico** (Kinamro en E.E.U.U), un hipolipemiente, es la primer droga de este tipo aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para un uso específico en los pacientes con Hipercolesterolemia Familiar (HF)<sup>(8)</sup>.

## Metabolismo lipídico y miRNAs

Hoy sabemos que el metabolismo lipídico está regulado de manera fina por múltiples miRNAs (Ver Tabla 1). En particular, la familia del miRNA-33, juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico y se han convertido en un nuevo blanco terapéutico para el posible tratamiento de desórdenes lipídicos<sup>(9)</sup>.

El miRNA-33, se ubica en intrones (*regiones no codificantes*) del gen SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein*), un factor de transcripción que participa en la biosíntesis de colesterol<sup>(10)</sup>. El SREBP actúa en el núcleo uniéndose a las regiones SRE (*del*

*inglés: Sterol Regulatory Element: elemento regulador de esteroides*) de una serie de genes importantes en la homeostasis celular de esteroides, regulando su transcripción. SRBP-2 y miRNA-33 se co-transcriben y expresan juntos en diferentes células y tejidos con un efecto global en la regulación del colesterol.

Uno de los principales blancos del miRNA-33 es el ABCA1 un miembro de la familia de transportadores ABC. Este gen estimula el transporte reverso de colesterol (*eflujo de colesterol*) de los tejidos a moléculas de HDL, lo que permite uno de los mecanismos de clearance del exceso de colesterol de las células hacia el hígado para su posterior eliminación en la bilis. Esto es de vital importancia ya que permite eliminar el colesterol de macrófagos cargados de lípidos que forman parte de la placa de ateroma, un importante mecanismo anti-aterosclerótico. Los niveles de miRNA-33 se correlacionan de manera inversa con los niveles de colesterol y con la expresión del ABCA1, lo que sugiere que este miRNA es regulado por la dieta. De esta forma cuando los niveles de colesterol en las células disminuyen, el aumento de la expresión de miRNA-33 asegura un nivel adecuado de colesterol en la célula.

Además de regular el metabolismo lipídico, el miRNA-33 participa en la regulación de otras vías importantes como: respuesta inflamatoria, secreción biliar, homeostasis de glucosa, balance energético, regulación del ciclo celular (Ver Figura 2). A través de la regulación de estas vías miR-33 juega un papel fundamental en

## Regulación del metabolismo lipídico por miRNAs

Tabla 1

miRNA	Blanco	Efecto
miR-33	ABCA1, ABCG1, NCP-1, ABCB11, ATP8B1, CROT, CPT1A, HADHB	↓ Eflujo de colesterol ↓ Secreción biliar Regulación del metabolismo de ácidos grasos (β-oxidación)
	SIRTUIN-6, AMPKa1	Regulación del metabolismo de glucosa ↑ Actividad HMGC0A-R y ACC
miR-122	HMGC0A-R, 7DHCR, MVK, HMGC0AS1, FDPS, SQLE	↑ Síntesis de colesterol
	MTTP, SREBP-1, FASN, ACC ½, SCD	↑ Secreción de VLDL ↑ Contenido hepático de AG (FA)
miR-758 miR-26 miR-106b	ABCA1	↓ Eflujo de colesterol
miR-370	Cpt1A miR-122	↑ β-oxidación ↑ Expresión de genes lipogénicos
miR-378/378*	FABP-4, FASN, SCD-1, KLF15, Resistin	Regulación de síntesis y guardado de TG

Modificado de: Norata y colaboradores *Atherosclerosis* 2013<sup>(6)</sup>

la iniciación y progresión de la aterosclerosis y se ha constituido en un importante blanco para nuevos fármacos<sup>(7)</sup>.

## Las nuevas terapias basadas en microRNAs

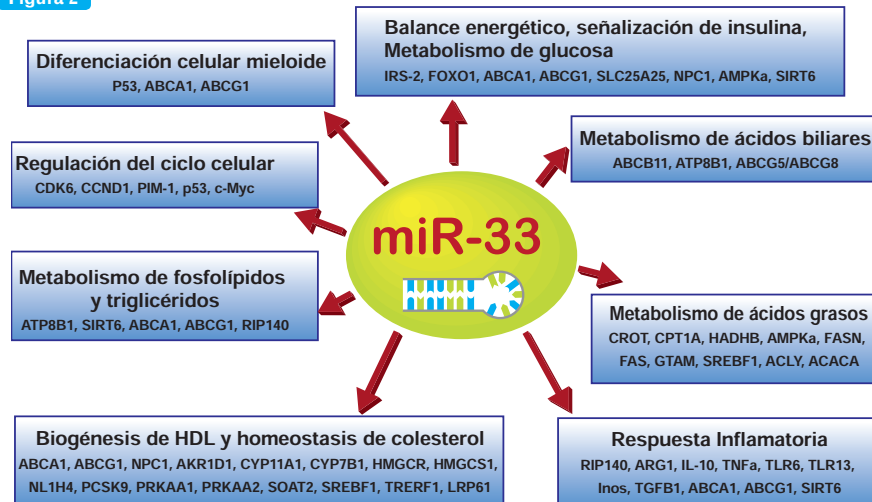
Gracias al conocimiento de los microRNAs y de la interferencia de ARN una nueva generación de medicamentos basados en ARN se encuentra en desarrollo usando oligonucleótidos antisentido, siRNAs, homó-

logos de miRNA y distintos tipos de inhibidores de miRNA<sup>(11)</sup> (Ver Tabla 2).

Empresas farmacéuticas como Santarispharma a/s, Regulus Therapeutics, miRNATherapeutics y Genzyme anuncian en sus páginas web el grado de avance de alguno de estos medicamentos para el tratamiento de enfermedades como cáncer, asma, enfermedades cardiovasculares y enfermedades infecciosas. Sin embargo solo uno de estos medicamentos llamado **Mipomersen** ha sido aprobado por la FDA para su uso en humanos para el tratamiento de pacientes

## Vías metabólicas reguladas por miRNA 33

Figura 2



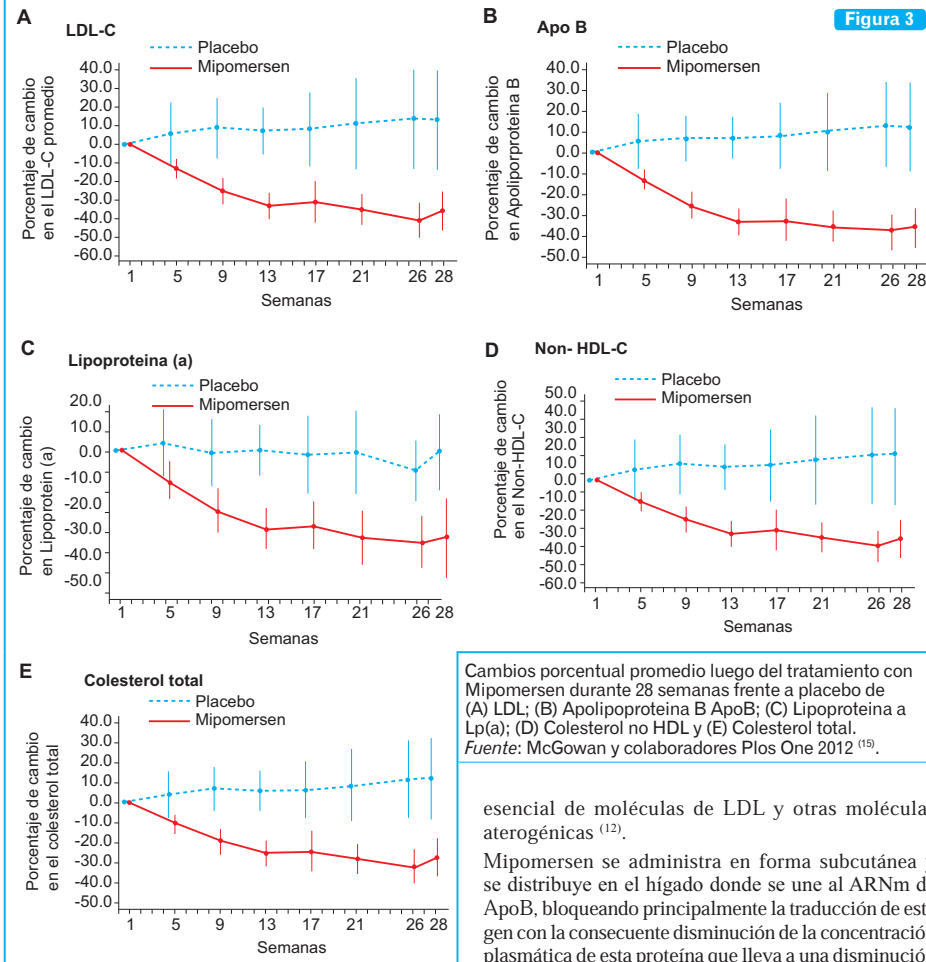
## Desarrollo de drogas basadas en ARN para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares

Tabla 2

Blanco	Droga	Enfermedad	Laboratorio
ApoB	Mipomersen ASO-LNA	Hipercolesterolemia familiar	Genzyme
miR 122	Miravirsén ASO-LNA	HCV, Hiperlipidemia	Santaris Pharma
PCSK9	SPC5001 anti PCSK9 ASO-LNA	Hipercolesterolemia familiar	Santaris Pharma
ApoB	SPC4955 ASO-LNA	Hipercolesterolemia familiar	Santaris Pharma
miR-208	MGN-9103 ASO-LNA	Mejora la función cardíaca Falla cardíaca tiene beneficios para tratar	miRagen Therapeutics
miR-29	miR 29 mimético modificado	Fibrosis	miRagen Therapeutics
Familia miR-15	MGN-1374 ASO-LNA	IAM Reducción del área de infarto mejora de la función cardíaca	miRagen Therapeutics
miR-34	LNA-anti-miR-34a	Atenua remodelación cardíaca y mejora función cardíaca	miRNA
miR-103/107	anti-miR modificado	Mejora homeostasis de glucosa y sensibilidad a insulina	Regulus Therapeutics, Alnylam
miR-21	RG012 20 anti-miRNA modificado	Fibrosis Síndrome de Alport	Regulus Therapeutics, Sanofi Aventis

Modificado de: Hennessy y colaboradores *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2013<sup>(11)</sup>

## Cambio porcentual promedio con el uso de Mipomersen hasta la semana 28



Cambios porcentual promedio luego del tratamiento con Mipomersen durante 28 semanas frente a placebo de (A) LDL; (B) Apolipoproteína B ApoB; (C) Lipoproteína a Lp(a); (D) Colesterol no HDL y (E) Colesterol total.

Fuente: McGowan y colaboradores Plos One 2012<sup>(15)</sup>.

esencial de moléculas de LDL y otras moléculas aterogénicas<sup>(12)</sup>.

Mipomersen se administra en forma subcutánea y se distribuye en el hígado donde se une al ARNm de ApoB, bloqueando principalmente la traducción de este gen con la consecuente disminución de la concentración plasmática de esta proteína que lleva a una disminución del colesterol total y de LDL colesterol<sup>(8, 13, 14)</sup>.

Recientemente la FDA aprobó el uso de Mipomersen para el tratamiento de pacientes homocigotos con HF, un desorden genético del metabolismo lipídico que se caracteriza por niveles aumentados de LDL y colesterol, y mayor riesgo de eventos cardiovasculares precoces<sup>(12)</sup>.

En un estudio randomizado, multicéntrico, doble ciego McGowan y colaboradores<sup>(15)</sup> demostraron que usando Mipomersen en una dosis semanal de 200 mg (controles=39 placebo=19) en pacientes con HF severa ( $LDL > 200 \text{ mg/dl}$  más enfermedad coronaria o  $LDL > 300 \text{ mg/dl}$  sin enfermedad coronaria) en dosis

máximas de hipolipemiantes, el tratamiento con Mipomersen conduce a una reducción de los niveles de LDL-C cercana al 36% sobre la línea de base.

Otro efecto beneficioso del uso de este fármaco es que también se reducen los niveles de otras moléculas aterogénicas, o que han demostrado ser factores de riesgo cardiovascular como colesterol total, ApoB, lipoproteína a y colesterol no HDL (Ver Figura 3). En cuanto a la seguridad del fármaco, este trabajo demuestra que es seguro, presentando pocas reacciones adversas entre las que destacamos reacciones en el sitio de inyección y un síndrome de tipo gripal.

Otros dos trabajos muestran que Mipomersen es efectivo en el tratamiento de pacientes con HF homocigotos<sup>(16)</sup>, o heterocigotos mas enfermedad coronaria<sup>(17)</sup> y que están al tope con sus terapias hipolipemiantes con reducciones significativas de los niveles de LDL y de otras lipoproteínas aterogénicas.

Además Stein y colaboradores, muestran que en pacientes que no logran niveles óptimos de LDL a pesar de recibir dosis máximas de estatinas, el agregado de Mipomersen permite alcanzar la meta terapéutica de  $LDL < 100 \text{ mg}$  en el 45% de los pacientes que recibieron este fármaco<sup>(17)</sup>.

En otro trabajo Akdim y colaboradores, evaluaron el uso de distintas dosis de Mipomersen en monoterapia

en una población de pacientes con hiperlipemia media a moderada ( $LDL$  de 119 a 266 con una media de 173) sin diagnóstico de HF, y sin ninguna otra condición que sea causa secundaria de dislipemia. En este grupo muestran una reducción significativa dosis dependiente de LDL y otras moléculas aterogénicas incluyendo grandes reducciones en los niveles de triglicéridos<sup>(18)</sup>.

#### En conclusión:

- Mipomersen solo o en combinación con otros hipolipemiantes es efectivo para tratar pacientes homocigotos y heterocigotos con HF y pacientes con otras dislipemias que no sean HF.
- Además, este fármaco es una gran alternativa en pacientes que no toleran estatinas, o que a dosis máximas de estas no llegan a los niveles recomendados de reducción del LDL con pocos efectos adversos.

### Terapias génicas en desarrollo basadas en ARNs

#### siRNAs

Los siRNAs son ARNs doble cadena de unos 19-25 nucleótidos de longitud y tienen gran homología con su blanco, lo que les da mayor especificidad y minimiza la aparición de efectos indeseados. Sin embargo, hay dificultades para usar siRNA en la práctica clínica de-

Ahora también en su celular!!!

**farmanuario+**  
Vademécum Móvil

- Reseña técnica de todos los medicamentos
- Precio actualizado de venta al público
- Medicamentos Similares
- Lanzamientos y precios siempre actualizados

Feliciano Rodríguez 2651 esq. Soca  
ventas@farmanuario.com - www.farmanuario.com





bido a problemas en la llegada a los órganos o tejidos blanco, reacciones en el sitio de inyección y respuestas inflamatorias mediadas por interferón<sup>(11)</sup>.

### miRNAs

Los miRNAs están desregulados en muchas enfermedades desde cáncer<sup>(19)</sup> a depresión<sup>(20)</sup> y cómo actúan sobre muchos blancos a la vez, es posible a través de la regulación de la expresión de un miRNA modular una vía en su totalidad.

Hoy en día se están desarrollando distintas estrategias para aumentar o inhibir la expresión de miRNAs.

### Inhibidores de miRNA

Para inhibir la expresión de un miRNA se están usando anti-miRNA que actúan uniéndose a su miRNA e impidiendo la unión del miRNA endógeno a su blanco. Los anti-miRNA contienen nucleótidos modificados LANS (*locked nucleic acids*), que aumentan su afinidad, estabilidad y especificidad por el blanco. También se pueden utilizar los llamados miRNA esponjas, que actúan secuestrando miRNAs, ya que presentan secuencias complementarias a las regiones

semillas de miRNA. Un problema al utilizar estos es que es difícil determinar su dosis. Pero como pueden ser administrados usando vectores virales, es posible inducir su expresión en un tipo determinado de célula y/o tejido<sup>(21)</sup>.

### Análogos de miRNA

Los análogos de miRNA o miRNA miméticos pueden usarse terapéuticamente en enfermedades o distintas entidades en que ya sabemos que la disminución de la expresión de un miRNA tiene aparejado una consecuencia deletérea o la represión de una vía que lleva a determinada patología. Sin embargo por su característica de ARN, el desarrollo de este tipo de drogas ha encontrado las mismas dificultades que los fármacos basados en siRNA, principalmente dificultades en la llegada a determinados tejidos<sup>(11)</sup>.

Para resolver este problema se están utilizando vectores virales que permiten expresar o reprimir miRNAs en tejidos u órganos específicos habiendo obtenido resultados exitosos<sup>(22,23)</sup>.

**Recibido:** 14 abril 2014  
**Aprobado:** 16 mayo 2014

## Bibliografía

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75(5):843-54.
- 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(6669):806-11.
- Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 2011;12(1):19-31.
- Huang B, Zhang R. Regulatory non-coding RNAs: revolutionizing the RNA world. *Mol Biol Rep* 2014.
- Norata GD, Sala F, Catapano AL, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2013;227(2):209-15.
- Chen KC, Joo SH. MicroRNAs in atherosclerosis. *Kaohsiung J Med Sci* 2012;28(12):631-40.
- Chen WJ, Zhang M, Zhao GJ, Fu Y, Zhang DW, Zhu HB, Tang CK. MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology. *Atherosclerosis* 2013;227(2):201-8.
- Toth PP. Emerging LDL therapies: Mipomersen-antisense oligonucleotide therapy in the management of hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2013;7(3 Suppl):S6-10.
- Baselga-Escudero L, Blade C, Ribas-Latre A, Casanova E, Suárez M, Torres JL, Salvadó MJ, Arola L, Arola-Arnal A. Resveratrol and EGCG bind directly and distinctively to miR-33a and miR-122 and modulate divergently their levels in hepatic cells. *Nucleic Acids Res* 2014;42(2):882-92.
- Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Nääm AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328(5985):1566-9.
- Hennessey EJ, Moore KJ. Using microRNA as an alternative treatment for hyperlipidemia and cardiovascular disease: cardio-miRs in the pipeline. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;62(3):247-54.
- Bell DA, Hooper AJ, Watts GF, Burnett JR. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Vasc Health Risk Manag* 2012;8:651-9.
- Visser ME, Wagener G, Baker BF, Geary RS, Donovan JM, Beuers UH, Nederveen AJ, Verheij J, Trip MD, Basart DC and others. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, lowers low-density lipoprotein cholesterol in high-risk statin-intolerant patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J* 2012;33(9):1142-9.
- Gebhard C, Huard G, Kritikou EA, Tardif JC. Apolipoprotein B antisense inhibition—update on mipomersen. *Curr Pharm Des* 2013;19(17):3132-42.
- McGowan MP, Tardif JC, Ceska R, Burgess LJ, Soran H, Gouni-Berthold I, Wagener G, Chasan-Taber S. Randomized, placebo-controlled trial of mipomersen in patients with severe hypercholesterolemia receiving maximally tolerated lipid-lowering therapy. *PLoS One* 2012;7(11):e49006.
- Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, Lachmann RH, Gaudet D, Tan JL, Chasan-Taber S and others. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010;375(9719):998-1006.
- Stein EA, Dufour R, Gagne C, Gaudet D, East C, Donovan JM, Chin W, Tribble DL, McGowan M. Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2012;126(19):2283-92.
- Akdim F, Tribble DL, Flaim JD, Yu R, Su J, Geary RS, Baker BF, Fuhr R, Wedel MK, Kastelein JJ. Efficacy of apolipoprotein B synthesis inhibition in subjects with mild-to-moderate hyperlipidaemia. *Eur Heart J* 2011;32(21):2650-9.
- Lee CH, Kuo WH, Lin CC, Oyang YJ, Huang HC, Juan HF. MicroRNA-Regulated Protein-Protein Interaction Networks and Their Functions in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):11560-606.
- Li YJ, Xu M, Gao ZH, Wang YQ, Yue Z, Zhang YX, Li XX, Zhang C, Xie SY, Wang PY. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. *PLoS One* 2013;8(5):e63648.
- Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther* 2011;18(12):1104-10.
- Gentner B, Schira G, Giustacchini A, Amendola M, Brown BD, Ponzoni M, Naldini L. Stable knock-down of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods* 2009;6(1):63-6.
- Geisler A, Jungmann A, Kurreck J, Poller W, Katus HA, Vetter R, Fechner H, Müller DJ. MicroRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther* 2011;18(2):199-209.