

La omisión de exón cambiará la rápida Duchenne en una mucho más lenta distrofia Becker

Una entrevista con el Profesor Stephen D. Wilton

El Profesor Wilton es la Cabeza del Grupo de Medicina Molecular Experimental en el Centro de Desórdenes Neuromusculares y Neurológicos de la Universidad de Australia Occidental en Nedlands cerca de Perth. El 16 de julio del 2006, después de la Conferencia Anual del Parent Project Muscular Dystrophy de EUA en Cincinnati/Ohio, 13 – 16 de Julio de 2006, el Profesor Wilton contestó preguntas de *Guenter Scheuerbrandt, Dr.* en bioquímica (imprimadas en cursiva) sobre la omisión de exón, el acercamiento de investigación más avanzado hacia una terapia de la distrofia Duchenne.

Omisión de Exón, pruebas clínicas inician.

La omisión de exón (exon skipping) es una técnica que induce la síntesis de proteína en los músculos al ignorarse partes del mensaje genético del gen de la distrofina de modo que una distrofina más corta que la normal sea producida, así haciendo más lenta la rápida progresión de los síntomas de la distrofia Duchenne en una mucho más lenta distrofia Becker. Los fármacos potenciales son llamados oligonucleótidos en antisentido, abreviados como AONs u oligos. Durante la importante reunión aquí en Cincinnati, los detalles de esta técnica fueron discutidos en gran detalle, y no tenemos que repetirlos en esta entrevista.

Para iniciar, por favor explique a las familias con chicos con Duchenne, lo que los resultados muy prometedores de la investigación de omisión de exón significarán a quienes esperan desesperadamente una cura de esta terrible enfermedad.

Yo no usaría la palabra cura, la omisión de exón nunca curara la DM Duchenne. Lo mejor que podemos hacer es reducir la severidad, y en algunos casos, podemos ser capaces de reducirla mucho.

Prefiero ser cautelosamente optimista y decir que si vamos a hacer una diferencia con la omisión de exón, y será una diferencia modesta. Y si esto funciona mejor de lo que pensamos, será magnífico. Es muy importante mantener las expectativas muy templadas.

He discutido la omisión de exón muy a menudo con padres. Se los explico tan bien como puedo, y siempre añado que sólo ha sido probada en animales, y que nadie puede decir en este momento si esto funcionara en chicos también. Entonces explico que las pruebas clínicas con chicos con Duchenne que están siendo hechas ahora mostrarán si la omisión de exón funcionara en niños o no.

Esto es por qué en esta reunión particular decía que nuestro laboratorio era capaz de inducir la omisión de cada exón en la cadena del gen de la distrofina excepto el exón 1 y 79. Todos los exones del 2 al 78, podemos omitirlos. Tenemos un manuscrito en preparación y esta tomando más tiempo del esperado para afinar detalles. Muchos exones son fácilmente quitados, y unos cuantos son más obstinados pero desarrollamos modos de omitir exones difíciles.

Nuestras pruebas clínicas tienen que ser hechas despacio, concienzudamente, y paso a paso, lamentablemente para los padres que quieren un tratamiento ahora. Pero lo importante es que, tan pronto como un paso es tomado, estamos listos a tomar el próximo. Cualquiera es siempre

muy optimista cuando una prueba inicia, esperando que los resultados sean positivos. No hay ningunos grandes problemas de seguridad esperados cuando sólo un músculo está siendo tratado y luego más tarde quitado para el análisis. Hay un mayor riesgo cuando la prueba progresa a un tratamiento de cuerpo entero con cantidades mucho más grandes de AONs a ser administradas y hay una posibilidad de algún efecto secundario inesperado.

Pero uno no sabe cuanto durara la distrofina después de dos o cuatro semanas del tratamiento inicial. En la prueba británica propuesta, de una a cuatro semanas después del tratamiento, una porción entera de músculo será quitado y analizado primero por pruebas moleculares para ver si distrofina está presente. Esto será una prueba de principio para mostrar que la omisión de exón va a funcionar en humanos.

En este momento pienso que, uno no debería experimentar con diferentes dosis o tiempos, porque la prueba real será un tratamiento de cuerpo entero, un tratamiento sistémico para demostrar que la omisión de exón realmente trabaja en músculos humanos. Y esto va a ser muy, muy difícil, porque no sabemos cuantos AONs necesitaremos, y con que frecuencia ellos tendrán que ser administrados.

Francesco Muntoni, que conducirá la prueba británica, una vez dijo "Tengo una pesadilla: ¿Cómo calculamos la dosis? ¡En diez años, todavía hablaremos de las mismas cuestiones que conciernen ahora al tratamiento con corticoesteroides, un día con, un día sin, 10 días con, 10 días sin, o cuándo el viento sopla del este!" Y tenemos sólo dos corticoesteroides relacionados, y todavía no sabemos como ellos funcionan.

Ahora para la omisión de exón, tendremos que buscar compuestos diferentes para pacientes diferentes dirigidos a mutaciones diferentes. Cada paciente responderá diferentemente. Esto va a ser una muy, muy difícil investigación. Pero puedo ser demasiado pesimista aquí.

Los investigadores Holandeses en Leiden tratan ahora de omitir los exones 51 y 46. Y ellos ampliarán esto a otros exones. ¿Tendrán ellos que pasar por los largísimo procedimientos enteros de aprobación?

Tendrán que tener aprobaciones, porque técnicamente cada nuevo oligo es una nueva medicina. Pero lo que esperamos es que los oligos para los primeros procesos sean ejemplos seleccionados, y que para oligos subsecuentes en fila los procedimientos de aprobación puedan ser acortados, si todos oligos se comportan de manera similar y no inducen ningún efecto secundario.

Trabajamos con oligos modificado de una química diferente llamados *morfolinós*. Este tipo de compuesto ha

sido ya sistémicamente administrado a humanos como antibióticos potenciales. Ellos han mostrado ser seguros, porque ellos no son destruidos en el cuerpo, y parecen ser absolutamente estables. Extensas pruebas ya han sido hechas con ellos, y así pueden no necesitar tales pruebas clínicas extensas como, por ejemplo, otros AONs modificados, los investigadores Holandeses usan, los 2O-metil-fotioato-protégidos, que no han sido administrados a humanos. Los morfolidos, por otra parte, tienen una estructura central completamente diferente. Ellos no están cargados y porque ellos son tan raros, no hay manera que ellos puedan integrarse en el genoma. Así que lo que hacemos realmente no es terapia génica, pero es una modificación de la expresión génica.

Si los pocos primeros morfolidos muestran ser seguros como fármacos para distrofia muscular, esperaríamos que la gente a cargo de la regulación de fármacos tomara experiencias previas en los perfiles de seguridad de los morfolidos en la consideración, y puede ser posible relajar ligeramente las pautas en lo que tiene que ser hecho para nuevo oligos. Si tuviéramos que hacer pruebas extensas para cada oligo, podríamos bien detenernos ahora, sería simplemente completamente insostenible y no seríamos capaces de tratar muchas de las mutaciones diferentes que causan distrofia muscular Duchenne.

Uno de los aspectos más importantes a considerar es, que los oligos no son simples fármacos convencionales, y que ofreceríamos un tratamiento personalizado, una terapia molecular personalizada para un chico con Duchenne.

Ahora, la compañía AVI Biopharma en Portland, Oregon, EUA, desarrolla oligo morfolidos como agentes antivirales, que podrían usarse potencialmente en cientos de miles de personas. Y por lo tanto, con algo dirigido a la población general, usted debe tener pruebas de seguridad extensas para asegurarse que el 0.1 % de ellos no tenga ninguna reacción adversa inesperada o imprevista. En contraste, nuestros oligos para Duchenne no serían administrados a miles de personas, si no a casos muy específicos de distrofia Duchenne. Así que si hay un evento adverso, y esperamos no pasará, esto concerniría sólo a uno o dos muchachos, y ya que estos pacientes serán muy estrechamente supervisados durante el tratamiento, cualquier efecto adverso debería ser visto rápidamente y medidas apropiadas tomadas.

Todavía podría haber efectos dependientes de las diferentes secuencias de nucleótidos de los oligos. Tenemos que ser conscientes de tal riesgo. Pero este sería un caso de comparar los riesgos contra las ventajas. Aun si hay algunos efectos secundarios adversos con estos morfolidos en la localización de las mutaciones Duchenne, las ventajas de restaurar alguna expresión de distrofina podrían pesar más que los riesgos. Los corticoides tienen numerosos efectos secundarios pero éstos son aceptados actualmente como la mejor opción de tratamiento.

En esta reunión, *Dominic Wells* mostró que cuando él sólo inyectaba AONs directamente en los músculos de ratones, él conseguía una muy buena omisión de exón en el nivel del ARN después de 14 semanas. Así que estos morfolidos inducen la omisión de exón durante 14 semanas. Y la proteína va a ser más estable que el ARN. ¡Por lo que después de 14 semanas, usted debería conseguir mucha distrofina, y esto puede durar posiblemente durante hasta 26 semanas, que son 6 meses! Nunca esperé que esto

durara tanto tiempo. Esto funciona mejor de lo esperado. Y si hay una reacción adversa después de darle al chico un morfolido, quizás hay modos de controlar eso. Y entonces, el muchacho tendría quizás una semana incómoda, y luego esto va a ser 6 meses antes del siguiente tratamiento. Otra vez, tenemos que calcular si un tratamiento dos veces al año sería adecuado. Podríamos comparar esto con quimioterapia y radioterapia en el tratamiento del cáncer. Hay efectos secundarios terribles. Y son aceptados porque no hay nada más.

Dos tipos de oligonucleótidos en antisentido.

Los investigadores holandeses intentan en sus oligos, los 2O-metil-fotioatos, para omitir primero el exón 51, y usted y los británicos probarán morfolidos. ¿Pero ustedes trabajarán juntos, verdad? y cuál es la razón por la que los holandeses trabajan con este otro tipo de oligos?

Los holandeses buscan una variedad de exones diferentes, y los ingleses han hecho una comparación y han encontrado que los compuestos que desarrollamos, en particular los morfolidos, trabajaban muy bien, y decidieron usarlos para su prueba clínica que está todavía en la etapa de planificación. Ellos tratarán de omitir el exón 51, también, para tener esencialmente un estudio paralelo a la prueba holandesa. De este modo, ellos serán capaces de comparar diferentes químicas, diferentes secuencias, y comparar la eficacia de estos tratamientos diferentes. Esto realmente no podría ser hecho si ellos trataran de omitir otro exón. Así que, si ambos tipos de AONs están mostrando ser seguros, el trabajo en ambos lados va a ser alcanzado. Esperamos que ambos den resultados similares.

Nadie realmente sabe lo que va a pasar cuando hay una exposición a largo plazo a cualquiera de estos oligos diferentes. Es hasta posible que un tratamiento necesite una combinación de oligos. La idea es, que la competencia es sana, y que no guardamos todos los huevos en una cesta. Si ambos sistemas prometen, ambos tienen que ser alcanzados. Y otra vez, si algo pasa después de tres años del tratamiento morfolido, entonces retrocederemos a los 2O-metilos. Pero si no tuviéramos nada más que los morfolidos en aquel momento, estaríamos en problemas. Pero además de los morfolidos y los 2O-metilos, hay otros tipos de AONs disponibles con otras químicas con las que trabajamos.

Los primeros experimentos de omisión de exón.

¿Quién realmente tuvo la primera idea sobre la omisión de exón?

Pienso que fue desarrollada simultáneamente en varios sitios diferentes. Yo había estado haciendo un trabajo en fibras revertantes con distrofina que aparecen espontáneamente en los músculos con Duchenne, y trataba de encontrar cual era el mecanismo. Y para mí era lógico que esto fuera algún mecanismo de omisión de exón. Era alrededor de 1994, y encontramos algunas transcripciones de genes, y algo de funcionamiento de ARNm para distrofina acortada. Y luego al final de 1996, en una reunión en el Lago Tahoe, EUA, encontré a *Ryszard Kole* de la Universidad de Carolina del Norte. Él hablaba de la supresión del empalme anormal en el gen β -globina como una terapia para la talasemia. Por lo que sé, él era la primera persona en

modificar la expresión de un gen por modificación del empalme. ¡Después, Ryszard y yo hablábamos bastante tiempo, y luego en uno de esos momentos que pasan cuando algo le golpea casi literalmente como un ladrillo! Era simplemente tan obvio, que este era el modo de ir. ¿Si usted pudiera usar AONs para suprimir el empalme anormal, por qué no aplicar el mismo acercamiento para el empalme normal, también? Unas semanas después del regreso a Perth, recibí algunos oligos de Ryszard. Teníamos algunos cultivos con fibras de músculo que no estaban muy bien, pero hicimos algunos experimentos de todos modos en seguida, y conseguimos la omisión de exón en nuestro primero experimento con uno de los oligos de Ryszard.

¿Entonces usted fue quién aplicó por primera vez esta técnica en la distrofia muscular?

Por un lado, sí, al menos en una tentativa de quitar una enfermedad causada por una mutación del ARNm de la distrofina. Pero pienso, *Masafumi Matsuo* en Kobe en Japón también aplicó AONs a la transcripción del gen de la distrofina. Él lo hizo antes, pero yo no estaba informado de esto entonces. Pero estaba produciendo una mutación, la delección de "Kobe" del exón 19 en una transcripción del gen de la distrofina normal. El fue probablemente la primera persona que estaba haciendo omisión de exón en el gen de la distrofina.

El ha tratado ahora a un chico con Duchenne con una delección del exón 20 inyectando en su flujo sanguíneo un oligo de ADN especial contra el exón 19. De acuerdo a una publicación reciente, 6 % de la cantidad normal de ARNm de distrofina fue encontrado y también alguna proteína distrofina. Pero de los datos que encontré, no era convincente. Cómo sea, el pudo mostrar que la omisión sistémica en chicos con Duchenne es posible sin efectos secundarios peligrosos.

Pienso que el problema principal fue la elección de este oligo de ADN, que, como yo comprendo, reacciona con el ARN en alguna manera que el ARNm es destruido por una enzima llamada ARNseH. Habría sido una carrera entre el mecanismo de omisión de exón y la degradación del ARNm por el ARNseH. Repetimos el trabajo de Matsuo en ratones y descubrimos que este tipo de oligo de ADN funcionaba en algunos objetivos pero no en otros. Además, cuando usamos un oligo 2O-metil de la misma secuencia para el exón 19, este compuesto era 30 a 40 veces más eficiente. La razón era que es un oligo estable, que llegaba dentro las células para producir omisión de exón y no producir el mecanismo del ARNseH.

¿Cuándo habrá una terapia de omisión de exón?

El gen fue encontrado hace 20 años. Todo el mundo estaba muy excitado porque tendríamos el próximo año una cura. ¿Qué puede decir actualmente a los padres que sienten que el tiempo para sus niños se está acabando? Hace dos años, Gertjan van Ommen de la universidad de Leiden, Holanda, me dijo en una entrevista que tomaría aproximadamente 10 años hasta que la omisión de exón trabajará en los niños. Dos años han pasado, así que ocho años restan. He preguntado a las familias si realmente desean saber eso, y su respuesta fue: "Si, deseamos saberlo, y entendemos que tales estimaciones no pueden ser precisas, y que esta estimación no quiere decir que en

enero del 2014 exactamente ahí habrá algo para nuestro hijo." ¿Cual es la situación ahora? ¿Cuánto tiempo piensa usted que pudiera tomar?

Sí, sé que éstas son cosas terribles. Éste es el sexto año que vengo a los encuentros del Parent Project. Desafortunadamente, conozco a nuevas personas cada año, y cada año, algunas personas no están más aquí. Pero tenemos que proceder despacio y cuidadosamente y un paso antes de otro para evitar errores que harían el tiempo de espera aun mayor.

Sin embargo, soy optimista de que, si los primeros ensayos clínicos son hechos cuidadosamente y sin peligro, entonces muy rápidamente planeamos seguir con nuevas pruebas. Y en las nuevas pruebas incluiríamos nuevos blancos, para poder omitir otros exones y abordar mutaciones diferentes. Así que no esperaremos por años para ver qué ocurre y analizar los resultados. Si obtenemos un resultado positivo en una prueba, pondremos en marcha el próximo pasó lo antes posible.

Y una manera en cómo podríamos acelerar el trabajo es, que en vez de tratar de omitir solamente un exón a la vez, podríamos apuntar a dos exones o aun mas, por lo tanto, hacer multi-omisiones de exón simultáneamente. ¿Porque no usar un cóctel de oligos para omitir varios exones a la vez? Hemos hecho actualmente esto en cultivos de células con una mezcla de oligos para remover los exones 50, 51, 52 y 53 simultáneamente, y trabajan razonablemente bien. Y hemos trabajado con otro preparado, dirigido a los exones 6, 7, y 8, que eran los exones del perro distrófico que necesitan ser omitidos. Así que podíamos probarlo en el perro antes de trabajar con humanos. Muchas mutaciones diferentes podían ser alcanzadas por uno de estos cócteles. Y una ventaja de usar un cóctel es que usted podía probar de forma segura tres o más oligos de una sola vez. Y pudimos aun combinar diferentes oligos. Eso aceleraría considerablemente la investigación.

Así que, cuando ahora mira, la estimación de Gertjan es muy realista, tal vez el tiempo será más breve, 5 a 6 años desde ahora hasta que podamos tratar a los primeros chicos con buenos resultados.

Cuando hablo a las familias, a menudo los escucho decir: "¿Por qué la DM Duchenne nos toco? ¿Cuál es la razón?" "La razón son las mutaciones, y ocurren al azar, no pueden ser pronosticadas", contesto. Pero las mutaciones son sólo herramientas de la evolución. Si no hubiera ninguna mutación, no estaríamos aquí, no habría vida real sobre la tierra, quizás sólo fango. Pero la evolución también hizo a científicos - como usted - que están tratando de enderezar esto, reparar el gen, resolver ese problema encontrando una terapia.

Es una manera interesante de mirarlo. Es verdad, sin la evolución, no habríamos evolucionado ni siquiera. Para mirarlo, todos son diferentes, todos probablemente tienen genes de la distrofina ligeramente diferentes. En algunos casos hay el cambio de una sola base en los exones que codifican la proteína, pero esto cambia un aminoácido y en general no es significativo, a menos que ése fuera un aminoácido muy importante. Cada gen de la distrofina es levemente diferente, y la variación genética se extiende a otros genes y a los genes que controlan la expresión de genes. Somos un paquete genético muy complicado y ésa es la razón para los diferentes síntomas clínicos que encontramos en diferentes pacientes de Duchenne.

Fabricando los oligos.

¿Quién actualmente hace los oligos? Son probablemente hechos automáticamente.

Yo personalmente he hecho los oligos 2O-metil que usamos, con una máquina que tenemos en el laboratorio. Presioné botones para afinar las secuencias de los AON, puse los reactivos y los mantuve en su mayor nivel, y perdí mucho tiempo de sueño, cuando tuve que mirar la síntesis. Los químicos son muy costosos y odio desperdiciarlos así que el sintetizador era mantenido funcionando las veinticuatro horas cuando es cargado con los químicos. Ahora, hay muchas compañías quienes hacen oligos pero prefiero algo de control sobre el proceso. También consigo aprender más sobre la química. Una vez que optimicemos nuestros 2O-metilos en células cultivadas, contactaremos a Avi Biopharma en Oregón, la compañía que ahora hace nuestros morfolinós. Ellos hacen esto en un acuerdo de colaboración y ha sido muy alentador y bueno trabajar con ellos. Más importante, pueden hacer morfolinós de grado clínico para las pruebas.

¿Estos oligos serán costosos cuando todo este listo para los chicos?

Serán costosos, pero no tan costoso como la producción de virus para el reemplazo génico. La omisión de exón será muchas veces más barata. El costo de hacer estos oligos es cuantioso, y todavía necesitamos muchos morfolinós con diferentes secuencias. Pero si podemos diseñar oligos que trabajen muy eficientemente en cantidades pequeñas, que usted puede administrar en una dosis baja y todavía ser terapéuticos, entonces estos fármacos podrían no ser tan costosos.

El diagnóstico preclínico temprano será importante.

Si la omisión de exón u otra técnica trabajan, ¿No debe ser aplicada temprano antes de que los músculos desaparezcan? Todavía tengo mi laboratorio de detección trabajando, pero está muriendo. Deseo que pudiera encontrar a algún inversionista que pudiera esperar cinco años hasta que pueda rembolsar su dinero y más de eso para promover y hacer detección de recién nacidos para distrofia muscular. En los Estados Unidos, ahora hay programas pilotos en Atlanta y Columbus/Ohio.

La detección temprana será importante. Y posiblemente, si la omisión de exón fuera a trabajar y demuestra ser segura, entonces, después de una diagnosis temprana, usted podría empezar a tratar antes que ningún síntoma se presente del todo. Y eso pudiera hacer una gran diferencia. Así que creo que la detección de recién nacidos para distrofia muscular es una buena idea y debe estar disponible en todos lados.

¿Entonces hay un mensaje de esperanza?

¿Al final de esta entrevista, usted diría por favor algunas

palabras a los padres para mantener la esperanza después de un encuentro importante como este en Cincinnati?

Déjeme darle una sorpresa primero: el progreso con los morfolinós, que ha sido hecho en el año pasado, fue asombroso, obtuvimos resultados más allá de nuestras expectativas. Somos optimistas que trabajamos mucho, pero mucho mejor de lo que anticipamos. Al principio de nuestro trabajo, encontramos que los morfolinós funcionaban muy pobremente en cultivos de células. Y cuando empezamos el trabajo en ratones con inyecciones in-vivo, estábamos haciendo todos estos trucos extravagantes para conseguir administrar los morfolinós en los músculos. Estaba trabajando en principio, pero entonces sólo probamos un tipo de control negativo, el morfolinós en solución salina, sólo en un 0.9 % de ordinaria solución salina, y funcionaron maravillosamente, sin ningún portador, sin ninguna lipofectina o cualquier otro agente para aumentar la entrega. Los puros morfolinós en solución salina, ¡la más simple manera posible de administración, funcionando muy, muy eficientemente! Y entonces la gente en Avi Biopharma les agrego pequeñas secciones de péptido a ellos para aumentar la entrega aún más, y estas cosas trabajan sumamente bien en ratones. Ahora, tenemos que probar esto en humanos. La gente de AVI, que hacen los morfolinós, es muy reactiva e innovativa. Ellos están desarrollando nuevas químicas, haciendo nuevas modificaciones, y es una maravillosa colaboración con ellos. Así que, los morfolinós son lo mejor por el momento. Yo espero, estos tipos tendrán algo aun mejor en el futuro.

Pero para terminar, quiero decir que este encuentro del Parent Project ha sido muy positivo. Hay tantos varios diferentes acercamientos de investigación para distrofia muscular hasta el momento. Hay muy buenas pruebas sobre reemplazo génico, de lectura a través, hay dos pruebas de omisión de exón, esta el trabajo de miostatina, hay tantas varias cosas diferentes que se están haciendo, y los corticoides están siendo estudiado en gran detalle. Hay razón para mucha esperanza.

Pero esto nunca va suficientemente rápido. Deseo que tuviéramos una cura ayer. Alguien me dijo: "Cure la distrofia muscular y entonces jubílese". Tengo 50 años ahora, y creo que continuaré trabajando en este campo por mucho tiempo. Pero si podemos hacer una diferencia pronto, será con la omisión de exón. Eso comprará un poco de tiempo hasta que algo mejor o más permanente llegue. No es un tratamiento perfecto. Pero es lo mejor que podemos hacer por el momento con muchos oligos y sin nuevos saltos espectaculares en tecnología.

Muchas gracias, ciertamente también de parte de muchas de las personas en todas partes del mundo que leerán esto entrevista: los chicos, sus padres y sus parientes, sus doctores y quienes los cuidan, los investigadores de DM Duchenne y quizás incluso personas influyentes que podrían cambiar cosas con el propósito de que usted y sus colegas consigan los fondos y la oportunidad de llegar a nuestro objetivo pronto, una terapia para muscular distrofia Duchenne.

Algunos hechos científicos son explicados.

Los **genes** son unidades funcionales de material genético de **ácido desoxirribonucleico, ADN**. Su estructura parece una escalera de mano entrelazada, la *doble hélice*. Los niveles de esta escalera de mano constan de cuatro moléculas pequeñas diferentes, las **bases**: *adenina, guanina, timina, y citosina* (abreviadas A, G, T, C). Para razones espaciales, los niveles pueden contener solamente dos tipos de combinaciones de bases, los **pares de bases** A-T y G-C. Por lo tanto, la **secuencia** de las **bases** sobre un pasamano o hebra es *complementaria* a la secuencia de la otra.

La mayoría de los genes llevan las instrucciones para la construcción de proteínas. En el núcleo de la célula, la instrucción genética de genes activos es **expresada**, es copiada, y transcrita, a otra sustancia genética, al **ácido ribonucleico pre-mensajero** o **ARNpre-m**, proceso llamado transcripción. La mayoría de los genes constan de regiones activas, los **exones**, que contienen la información para la creación de las proteínas, y de otras "inactivas", los a menudo mucho más largos **intrones**, que no obstante pueden ser importantes para el control de la expresión génica. Después de la transcripción, los intrones son retirados del ARN pre-mensajero, y los exones transcritos son **empalmados** entre ellos de sus extremos al **ARN mensajero, ARNm**, que se traslada entonces a los **ribosomas**, la estructura sintetizadora de proteínas fuera del núcleo. Los ácidos ribonucleicos, los **ARNs**, usan la base U, *uracilo*, en lugar de la similar base T del ADN.

En el ARN mensajero, tres bases consecutivas, un **codón** o *tripleta*, especifica un aminoácido de acuerdo con el **código genético**. Tres de los 64 codones diferentes, UAA, UAG, y UGA, son **codones de parada**, donde la síntesis de proteína es finalizada. No hay ningún espacio entre los codones. En los ribosomas, la instrucción genética del RNA mensajero es usada para la construcción de proteínas con 20 clases diferentes de sus componentes de construcción, los **aminoácidos**.

Las distrofias musculares Duchenne y Becker son causadas por una **mutación** o defecto del **gen de la distrofina** que lleva la información para la proteína **distrofina**. El gen está ubicado en el cromosoma X. Con una secuencia de 2,220,223 **nucleótidos**, o "letras genéticas", es con mucho el gen humano más largo. Solamente 11,058 nucleótidos, el 0.5 %, en los 79 exones de la distrofina especifican la secuencia de sus 3,685 aminoácidos.

La distrofina es necesaria para la estabilidad mecánica de las células del músculo. Está ubicada en el interior de las membranas de la célula muscular y que esta anclada por muchas otras proteínas, el **complejo distrofino-glicoproteico**.

Hay tres tipos de mutaciones del gen de la distrofina: **deleciones**, si uno o mas exones enteros del gen están faltantes, **duplicaciones**, si partes del gen están repetidas, y **mutaciones puntuales**, si un solo par de bases esta cambiado, eliminado o añadido. Como los codones de tres letras del ARN mensajero son leídos en los ribosomas uno después de otro sin interrupción, si la mutación elimina o añade codones enteros de tres pares de bases por vez, el **marco de lectura** no es alterado. En este caso, el marco de lectura se mantiene en orden y la distrofina hecha será más larga o más corta de lo normal. Si este cambio afecta estructuras no-esenciales de la distrofina, todavía puede ser

en parte funcional. Entonces una forma benigna de distrofia, distrofia muscular Becker, se desarrolla.

Sin embargo, si la mutación cambia el marco por uno o dos pares de bases, el marco de lectura **pierde su orden**. Entonces, un número de aminoácidos incorrectos es incorporado en la proteína empezando en el sitio de la mutación hasta que finalmente un nuevo y **prematureo codón de parada** es alcanzado. La distrofina incompleta no pueden cumplir su función normal, desapareciendo y la **distrofia muscular Duchenne** se desarrolla.

Los **sitios de empalme** son secuencias específicas dentro de los exones y en los bordes de los exones e intrones que son esenciales para el retiro correcto de las secuencias sin-codificación de los intrones del ARNpre-m. El empalmado mismo es logrado por **spliceosomas**, un complejo de muchos ARNs pequeños y proteínas.

La técnica de **omisión de exón** trata de transformar a una mutación Duchenne en una mutación Becker. Si una mutación altera el marco de lectura y causa distrofia Duchenne, el marco de lectura puede ser **restaurado** retirando artificialmente del ARN mensajero uno o más exones directamente antes o después de la deleción, duplicación o el exón que contiene una mutación puntual.

Los exones pueden ser eliminados del ARNm con **oligorribonucleótidos en antisentido, AONs**. Ellos son cortas estructuras de ARN que constan de cerca de 20 nucleótidos cuyas secuencias son construidas en tal manera de que se unen solamente en la secuencia complementaria dentro del exón a ser removido o en sus fronteras y *en ningún lugar más*. Estos AONs interfieren así con la maquinaria de empalmado con el fin de que los **exones seleccionados** no sean más incluidos en el ARNm por lo tanto, son *omitidos*.

El gen mismo con su mutación no es alterado por la omisión de exón, pero su ARNm no contiene más la información del exón o exones omitidos. Como este ARNm es más corto que lo normal, la proteína de distrofina es también mas corta, conteniendo menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes forman parte de regiones no-esenciales de la distrofina, como los dominios de la varilla central (central rod), resultara una proteína más corta que puede a menudo todavía realizar su rol estabilizador en la membrana de la célula muscular. El resultado sería el cambio de síntomas severos Duchenne a los síntomas muchos más leves de distrofia muscular Becker.

Una nota para aquellos que aprendieron un poco de química en la escuela: Los **oligonucleótidos** son piezas cortas de dos clases de ácidos nucleicos, ADN y ARN, (oligo significa pocos). Los las dos hebras de **ADN**, el ácido desoxirribonucleico, constan cada una de una cadena de fosfato alternado con unidades de desoxirribosa, su estructura principal. La desoxirribosa es una molécula de azúcar con cinco átomos de carbono, y en el segundo átomo de carbono su usual átomo de oxígeno esta faltante. Cada unidad de azúcar lleva una de las cuatro bases "genéticas" en su primer átomo de carbono. En el **ARN**, el ácido ribonucleico, tiene unidades de ribosa normales en su estructura principal con un oxígeno en su segundo átomo de carbono. Los **nucleótidos** son los bloques de construcción en ambas clases de ácidos nucleicos. Cada nucleótido consta de una ribosa, una base y un fosfato. Así que hay

cuatro diferente **ribonucleótidos** y cuatro diferente **de-soxirribonucleótidos** Los oligos hablados en esta entrevista son **oligorribonucleótidos en antisentido**, AONs. Antisentido significa que su secuencia de bases está en el orden contrario a una secuencia específica seleccionada en una de zona empalme en el ARNpre-m.

Lo dos tipos de oligos o AONs usados en la omisión de exón, son oligorribonucleótidos protegidos con el propósito de que no sean destruidos en las células musculares por enzimas. Los holandeses están usando los **20-metilfosfotioatos**, también llamados *metil-tioatos* o *2O-metilos*. Ellos tienen un grupo metilo, un carbono con tres átomos

de hidrógeno, unido al oxígeno del segundo carbono de las unidades de ribosa y un átomo de azufre en lugar de uno de los átomos de oxígeno de los grupos de fosfato. Los **morfolinos** que los investigadores británicos-australianos están usando, tienen uno de los oxígenos del fosfato reemplazado con un grupo dimetil amido, un nitrógeno con dos grupos metilos, y las unidades enteras de ribosa son reemplazadas por anillos morfolidos, seis anillos unidos, cada uno consiste de cuatro átomos de carbono, uno de oxígeno y un átomo de nitrógeno con átomos de hidrógeno unidos a los carbonos.

Prof. Stephen D. Wilton, PhD,
Centre for Neuromuscular and Neurological Disorders,
University of Western Australia,
Nedlands, Australia,
E-mail: swilton@cyllene.uwa.edu.au

Guenter Scheuerbrandt, PhD,
Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Alemania
E-mail: gscheuerbrandt@t-online.de
Internet: www.duchenne-research.com

Traducido y adaptado al español por:
Ricardo Rojas C.
Playa Rosarito 319 Fracc. Playa Sur
CP 82040, Mazatlán, Sinaloa, México
<http://www.distrofia-mexico.org>
distrofiasmusculares@yahoo.com.mx