



Igües no pequeño pa problemas grandes: tratamientos moleculares pa les enfermedades musculares y cardiovasculares

Por **Xurde Menéndez Caravia**

Department of Molecular Biology

Hamon Center for Regenerative Science and Medicine

University of Texas Southwestern Medical Center

Dallas, TX, EEXX

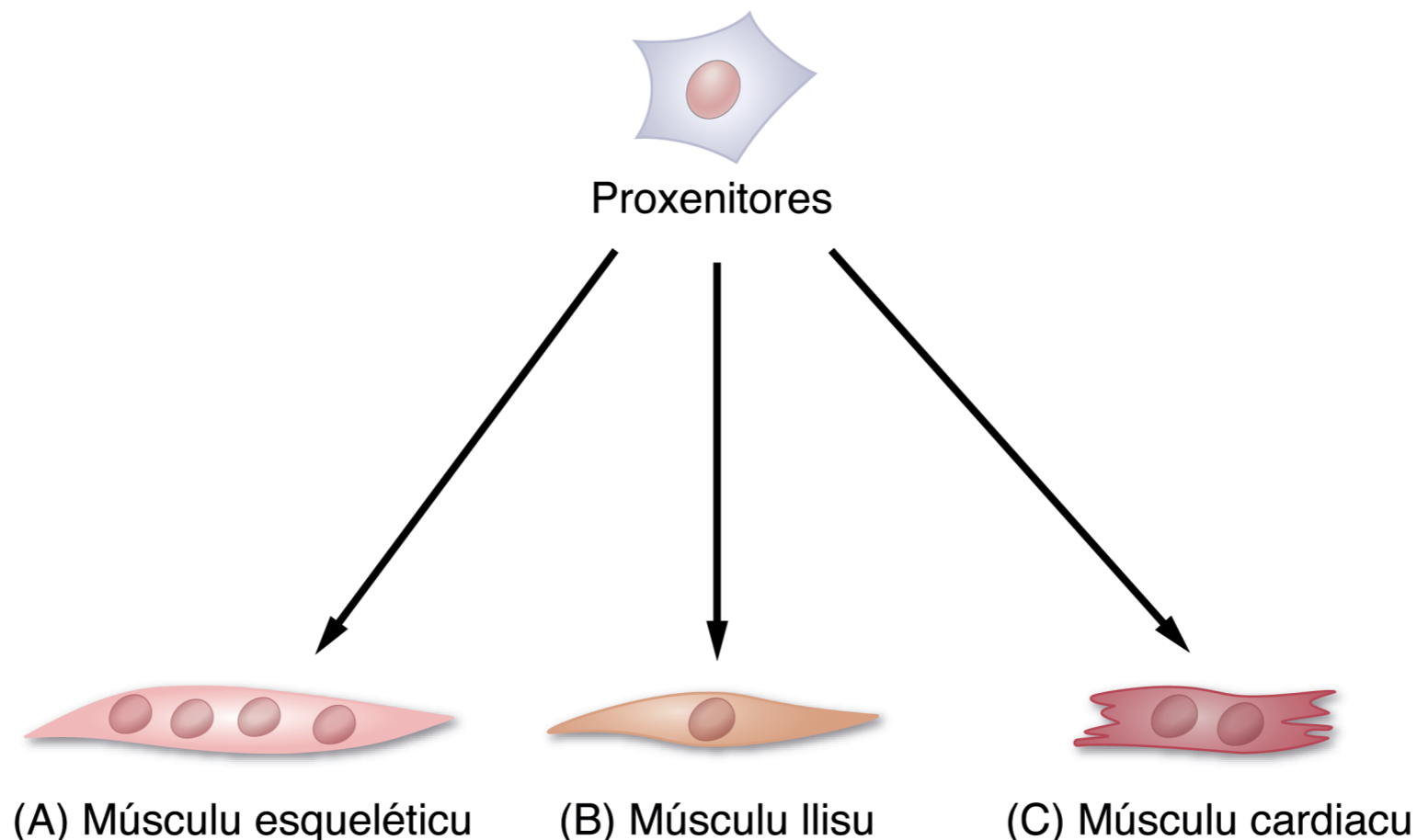
Seición microscópica del músculu tibialis anterior d'un mur.
Fiñes en verde apaecen un determináu tipu de fibres musculares

ENTAMU

El músculu ye'l texíu más importante del cuerpu. Esto ye porque los músculos son esenciales pa cualesquier aspeutu de la vida de los animales. Asina, los músculos representan ente'l 40 y el 50% del total del nuesu pesu y lleven alantre funciones tan básiques como'l movimientu, el bombéu del sangre o la dixestión.

Les células musculares o miocitos, del griegu *myos* (músculu) y *kytos* (célula), caracterícense pola capacidá de contraerse gracias a que tienen unes estructures subcelulares, nomaes sarcómeros, formaes por una riestra de proteínes esenciales pa facer esti procesu. Los humanos tenemos tres tipos básicos de células musculares que derivan de les células proxenitores musculares (Fig. 1).

- **(A) Músculu esqueléticu:** Fórmenlu los músculos que contraemos voluntariamente, por exemplu'l cuádriceps o'l bíceps, y que tán venceyaos a los güesos. Los músculos esqueléticos válennos pa facer los movimientos conscientes. Les células del músculu esqueléticu denomense fibres musculares y son, en xeneral, llargues y con muchos noyos.
- **(B) Músculu llisu o visceral:** Esti nome aplícase a los músculos que formen parte de muérganos internos como l'estómagu, l'intestín o los vasos sanguíneos. La contracción d'estos músculos, controlada pol sistema nerviosu autónomu, valnos pa emburriar y mover sustancias al través d'esos muérganos; como por exemplu'l sangre nos vasos sanguíneos o los alimentos nel intestín pa facer la dixestión.
- **(C) Músculu cardíacu:** Ta compuestu poles células musculares del corazón o miocardiocitos, que tienen la función de



bombiar el sangre dende'l corazón al restu del cuerpu. La contracción de los miocardiocitos ye autónoma y entama nun noyu del corazón, compuestu por miocardiocitos especializaos, que fai de marcapasos. Sicasí, les hormones y el sistema nerviosu controlen la velocidá de la contracción (1).

ARRIBA

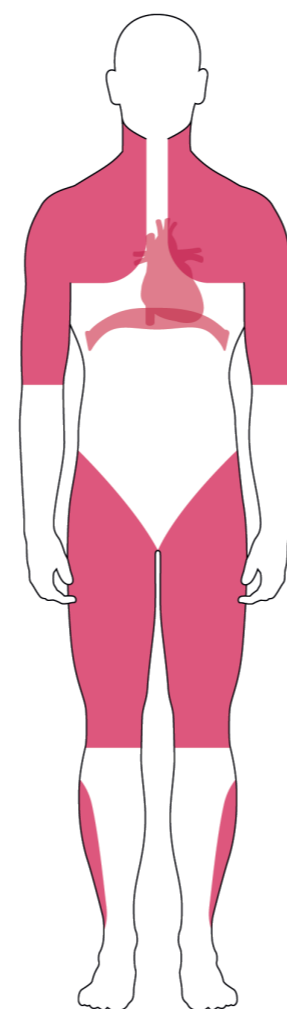
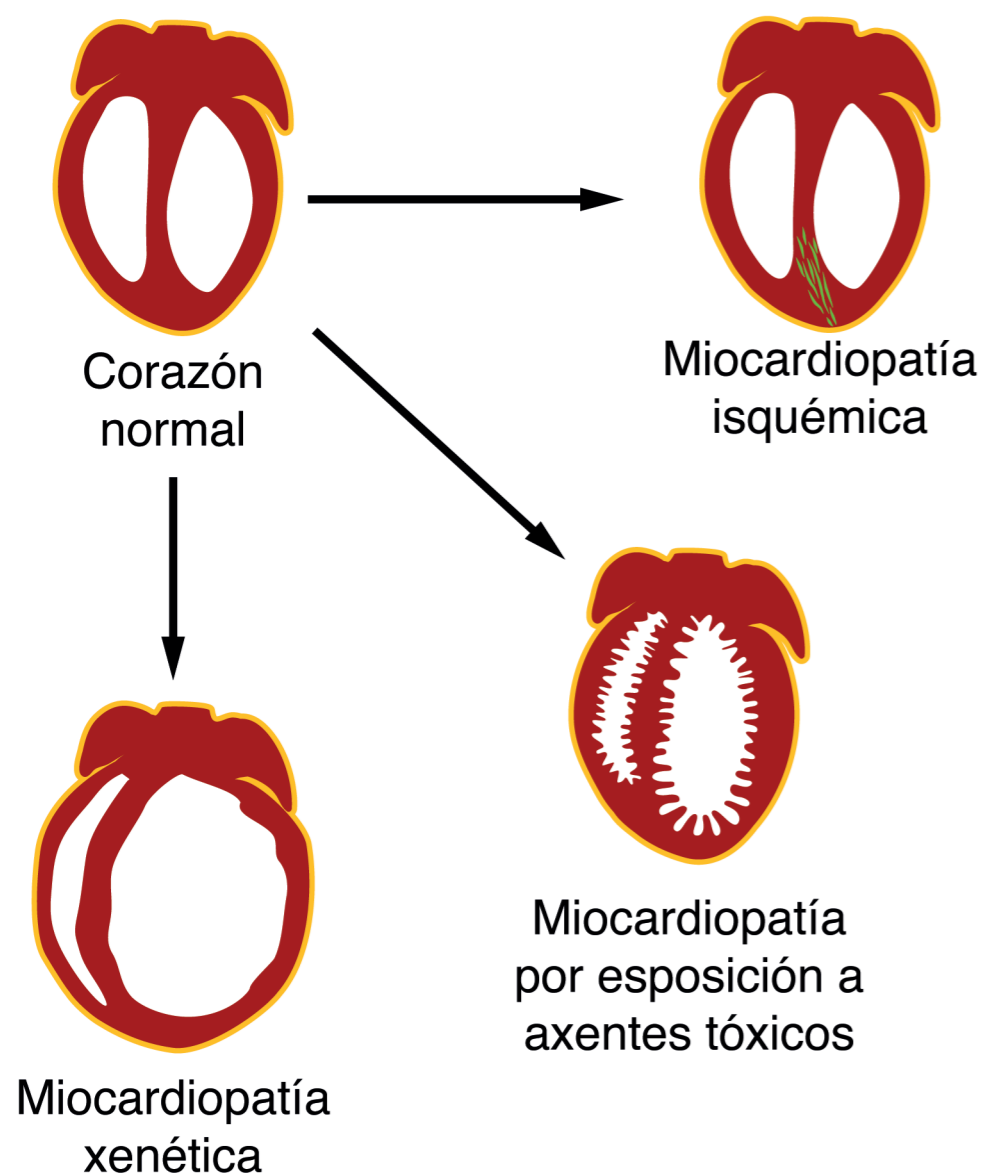
Figura 1. Tipos de células musculares n'humanos.
A partir de células proxenitores o «madre» surden les células musculares (A) esquelétiques, (B) llises o viscerales y (C) cardiaques.

Esti artículu céntrase nes enfermedaes de los músculos esqueléticos y del corazón. Na primer parte d'esti faise un percorríu peles carauterístiques más comunes y les causes de les malures más pernomaes del corazón, la vasculatura y los músculos esqueléticos. Na segunda estaya afóndase nuna esbilla d'aproximaciones terapéutiques nueves empobinaes a «arranchar» los defectos que causen estes patoloxíes o, pelo menos, a ameyorar enforma los sos síntomas. Estes estratexes de recién faen usu de preseos moleculares como ácidos nucleicos, enzimes y virus modificaos; y nel futuru afitaránse como la base de la denominada «medicina personalizada», ye dicir, la medicina moderna que tien en cuenta les carauterístiques propies y úniques de cada paciente a la hora de planificar el tratamientu.

ENFERMEDAES CARDIOVASCULARES Y MUSCULARES

Teniendo en cuenta'l papel cimero que tienen los músculos na fisioloxía humana, ye dicir, nel funcionamientu normal del cuerpu; nun ye extraño que les enfermedaes y malures que los dañen seyan pergafes.

Les enfermedaes cardiovasculares representen la primer causa de muerte nel mundiu desarrolláu (2). Ente elles, destaquen pola so severidá les enfermedaes qu'amalen direutamente'l corazón, tamién nomaes como miocardiopatíes. Dende un puntu de vista xeneral, les enfermedaes cardiovasculares surden pol dañu o la perda de los miocardiocitos; lo qu'asocede nel infartu de miocardi (dañu isquémicu por falta d'oxíxenu), la esposición a axentes tóxicos o por cuenta de



Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

IZQUIERDA

Figura 2. Diagrama xeneral de les enfermedaes del corazón. Les principales malures cardiaques divídense en (A) isquémiques, (B) causaes por axentes tóxicos y (C) xenéticas.

DERECHA

Figura 3. Músculos dañaos na distrofia muscular de Duchenne (DMD). Los neños con esta malura xenética carecen de defeutos nos músculos de les estremidaes, nel corazón y nel diafragma.

mutaciones xenéticas (Figura 2). Nel infartu de miocardi, estayes del corazón queden ensin oxíxenu por mor del taponáu d'una o varies arteries coronaries, que son les encargaes de llevar el sangre a les células cardiaques. Casu distintu ye la miocardopatía por esposición a axentes tóxicos, que se da, por exemplu, nos tratamientos de quimioterapia escontra'l cáncanu (3).

Les miocardopatías xenéticas (Figura 2) constitúin un grupu complexu y heteroxeneu de patoloxías con abondo interés biolóxicu y clínicu. Estes enfermedaes surden por mutaciones xenéticas, ye dicir, cambeos na secuencia d'ADN (ácidu desoxirribonucleico) de les células del corazón (4, 5). Estes mutaciones puen ser hereditaries, cuando les tienen dellos miembros dientro d'una familia, o de *novo*, ye dicir, adquiries pol propiu paciente por mor d'errores nes células xerminales o nel desendolcu embrionariu. Un exemplu de miocardopatía xenética ye la miocardopatía dilatada, definida por un enanchamiento de les cámares del corazón y una perda de la so contractilidá.

Al igual qu'asocede coles patoloxías del corazón, una parte bien importante de les enfermedaes de los músculos esqueléticos tienen tamién una base xenética, ye dicir, tán causaes por mutaciones nel ADN. D'ente toes elles rescampa pola so gafura ya impautu na población la distrofia muscular de

Duchenne (DMD) (Figura 3). Esta enfermedá, que carecen d'ella fundamentalmente homes (ún cada 5.000 nacíos vivos), carauterízase pola perda de la capacidá d'andar, el desendolcu de fallu cardiorrespiratoriu y la muerte prematura enantes de los 30 años (6).

NUEVOS TRATAMIENTOS MOLECULARES

Si consideramos les consecuencias de les malures musculares y cardiovasculares pa la salú humana, ye menester atopar tratamientos cada vez meyoeres y más afayadizos pa esta riestra d'enfermedaes xenéticas que dañen el corazón y otros músculos del cuerpu. D'ente estes malures, hai una parte bien importante que se denominen monoxéniques, que quier dicir que'l defeutu xenéticu que les causa ta nun xen solu (un xen ye'l fragmentu d'ADN que caltién les instrucciones pa facer una proteína, ye dicir, los xenes son unidaes discretas d'información xenética). El fechu de que defeutos nun únicu xen seyan los responsables de les enfermedaes monoxéniques representa una ventaya terapéutica bien importante, yá que si somos quien a iguar el defeutu nesi xen suprimiríamos la causa molecular de la enfermedá y, en teoría, podríamos llegar a curala.

Sicasí, y magar l'esfuerzu fechu n'investigación pública y privada, entavía nun hai cura pa denguna enfermedá muscular monoxénica. Los tratamientos que s'empleguen anguaño tán empobinaos a tratar los síntomas y non les causes moleculares de les enfermedaes. D'igual miente, los infartos de miocardi, vencyaos más bien a causes ambientales y del estilu de vida —aunque tamién hai predisposición xenética— siguen siendo una de les causes principales de muerte nel mundiu. Poro, hai una necesidá clínica, social y económica urxente de desendolcar terapias más dirixies y especializaes. Nesti sen, nos años

postreros surdieron dellos preseos moleculares y aproximaciones teunolóxiques que representen una oportunidá única pa conseguir tratamientos más avanzaos. Estes estratexes son: la terapia xénica, la igua xenética emplegando les ferramientes CRISPR y la rexeneración cardíaca.

1. Terapia xénica

La terapia xénica parte d'una idea bien cenciella: si nuna célula o nun muérganu determináu hai un xen que nun funciona, lo normal ye apurrir al paciente copies funcionales del mesmu xen. La terapia xénica nun ye dalgo nuevo na estaya de la biomedicina, de fechu'l primer protocolu aprobáu fíxose nel añu 1989. D'entós p'acá lleváronse a la práutica más de 3.000 ensayos clínicos en tol mundiu emplegando esta téunica. Sicasí, y por imposible qu'esto paeza, entá nun hai nenguna terapia xénica aprobada n'humanos pa les enfermedaes musculares o cardiaques (7, 8).

Hai munches modalidaes de terapia xénica. D'ente elles, una de les más granibles básase na

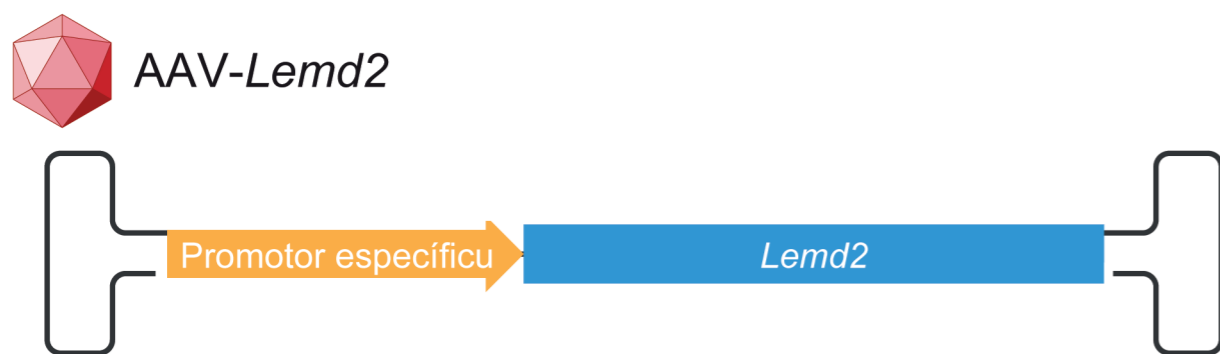
alministración del xen direutamente al paciente per aciu del emplegu de virus modificaos. Un exemplu d'esta alcontrámoslu nun estudiu de recién lideráu pol Dr. Eric Olson, referente mundial nel estudiu de les enfermedaes cardiaques y musculares. Esti trabayu presenta una terapia xénica nueva escontra la miocardiopatía dilatada causada por mutaciones nel xen *Lem2* que funciona, pelo menos, en mures. El xen *Lem2* codifica una proteína que s'alluga na membrana del noyu de les células y tien un papel cimeru nel ordenamientu del ADN, especialmente nos miocardiocitos (9, 10). Ye importante rescampiar qu'una mutación na secuencia de *Lem2* causa miocardiopatía n'humanos (11). Esti estudiu mandóse de virus adenoasociaos (AAV) p'alministrar la copia correuta de *Lem2* específicamente a miocardiocitos de mures neonatales (Figura 4). Esta aproximación terapéutica ameyoró enforma la función cardíaca de los mures mutantes, afitándola como intervención clínica potencial pa los pacientes humanos que carecen d'esta malura (12).

El sistema CRISPR descubriólu nes salines de Santa Pola (Alacant) l'investigador español Francisco Mojica nel añu 1987. Dellos años dempués adautóse como ferramienta bioteunolóxica pa modificar el material xenético y les investigadores Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, promotores d'esta teunoloxía, llevaron el Premiu Nobel de química nel añu 2020.

2. Iguu xenética col sistema CRISPR/CAS

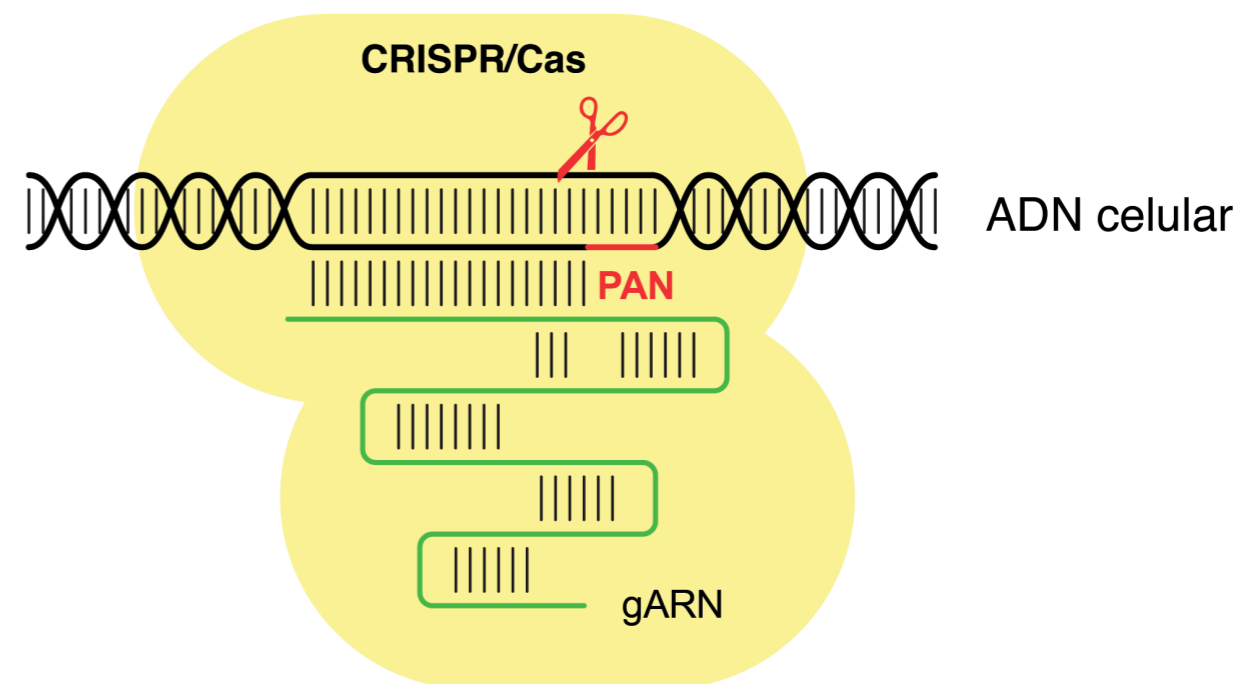
El sistema CRISPR (repeticiones palindrómiques curties agrupaes ya interespacias regularmente) ye un mecanismu inmunitariu de les bacteries que-yos val pa defendese de los fagos, un tipu de virus que les parasita. El sistema CRISPR descubriólu nes salines de Santa Pola (Alacant) l'investigador español Francisco Mojica nel añu 1987. Dellos años dempués adautóse como ferramienta bioteunolóxica pa modificar el material xenético de células eucariotes y, sobre manera, de células de Mamíferos (13, 14).

Esti sistema tien dos componentes esenciales: una proteína CRISPR-asociada, que tien el nome de Cas, y un ácidu ribonucleico, l'ARN guía (gARN). La proteína Cas funciona como unes tisories moleculares que corten l'ADN en secuencias perespecífiques. Pela so parte, el gARN ye un GPS molecular que dirixe a la proteína Cas hasta'l sitiü onde tien que cortar (Figura 5). La especificidá d'esti sistema determínase por una rexón del ADN, nomada PAN, que la proteína Cas9 reconoz.



ARRIBA
Figura 4. Terapia xénica cardíaca col xen Lem2.
Esquema del virus adeno-asociaü (AAV) emplegáu p'alministrar terapia xénica con Lem2 a ratones con miocardiopatía dilatada. La espresión del xen Lem2 (azul) ta controlada por un promotor específicu de miocardiocitos (mariellu).

DERECHA
Figura 5. Componentes del sistema CRISPR/Cas9.
Esquema onde s'amuesen la enzima Cas9, l'ARN guía (gARN) y la rexón PAN.



La ventaya del sistema CRISPR/Cas ye que nos val pa facer cortes perespecíficos na molécula d'ADN celular. Asina, y gracias a estos cortes, somos quien a iguar el xenoma, ye decir, a editar, eliminar o correxir mutaciones presentes nél y que causen enfermedaes. El desendolcu del sistema CRISPR/Cas supunxo una revolución auténtica pa la Biología Molecular y la Biotecnología. Tanto ye asina, que la investigadora francesa Emmanuelle Charpentier y la norteamericana Jennifer Doudna, promotores d'esta teunoloxía, llevaron el Premiu Nobel de química nel añu 2020 (15).

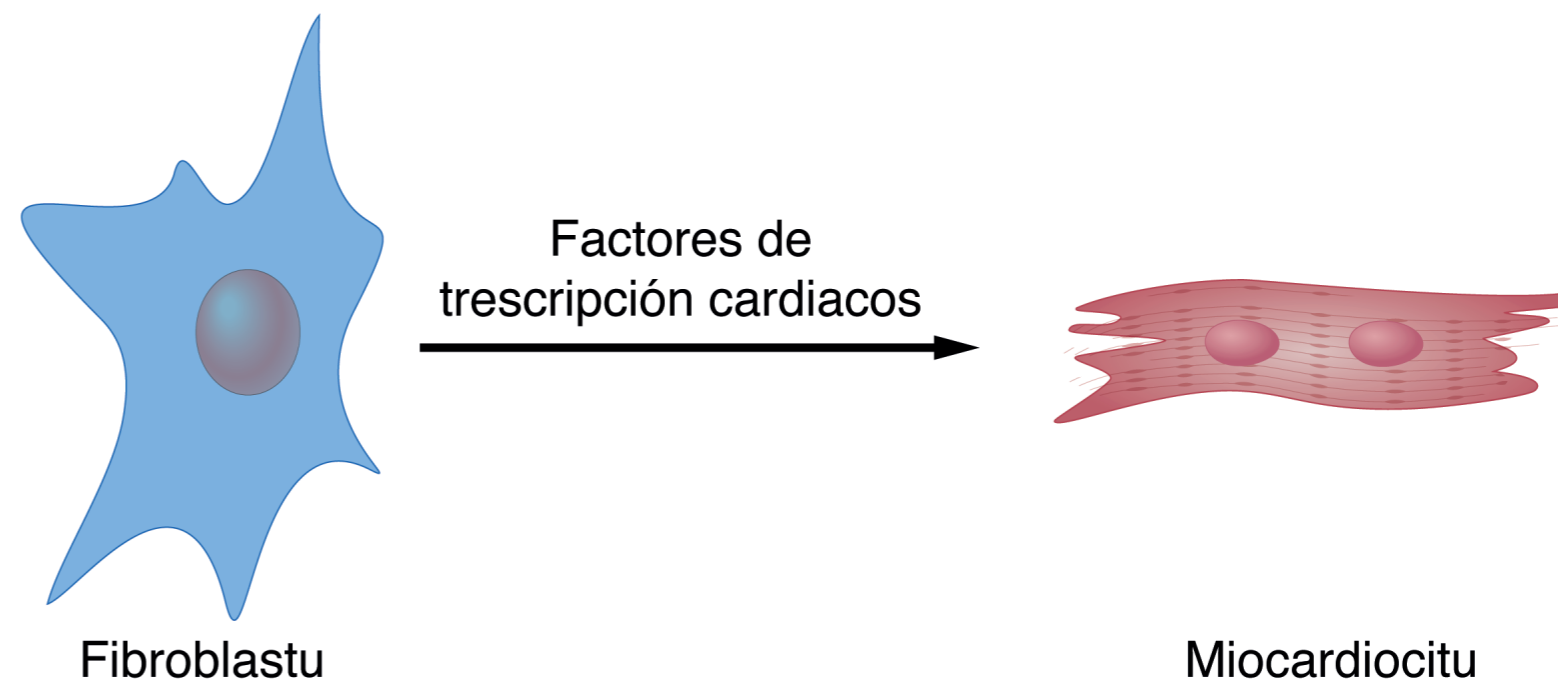
Gracias al emplegu d'esta teunoloxía, en munchos llaboratorios completáronse ensayos preclínicos, *in vivo* ya *in vitro*, onde se demostró la eficacia d'esti sistema pa iguar el xenoma y eliminar o pasar perriba d'una bayura de mutaciones patoxéniques. Asina, estudios fechos en células humanes y mures modificaos xenéticamente afitaron al sistema CRISPR/Cas como un candidatu interesantísimu pa entamar ensayos clínicos n'humanos con patoloxías cardiaques y musculares (6, 16).

Casu especial son los estudios que se ficeron en modelos animales de distrofia muscular de Duchenne (DMD). Como s'espunxo nun apartáu anterior, la DMD ye una enfermedá muscular xenética de consecuencias dramátiques pa los pacientes que la sufren. Ta causada por mutaciones nel xen que codifica la proteína nomada distrofina, que funciona como un amortiguador de les células. D'esta miente, les mutaciones nesti xen faen que la proteína nun s'esprese y les células musculares, al nun tener distrofina, sufren más dañu al contraese porque-yos falta l'amortiguador. Gracias al usu de los preseos CRISPR/Cas pudieron iguase munches de les mutaciones que causen DMD. Amás, lo prometedor de los resul-

taos llevó a «escalar» l'estudiu y aplicar estes estratexes a mamíferos más grandes. El resultáu d'esti trabayu d'investigación espublizóse nun artículu científicu nel añu 2018, onde se demostró la efeutividá d'esta téunica pa iguar el xenoma de perros con mutaciones causantes de DMD. Foi sorprendente ver cómo dempués del tratamientu con CRISPR/Cas los perros nun desendolcaben prácticamente nengún síntoma de la enfermedá. Anguaño, hai dellos ensayos clínicos en marcha que faen por llevar esta aproximación terapéutica a pacientes humanos.

3. Rexeneración cardiaca

D'ente toles enfermedaes cardiovasculares, l'infartu de miocardi y, posiblemente, una de les más mortíferes si atendemos al número total de persones que muerren por cuenta d'esta malura. Un infartu de miocardi defínese pola falta de riego nuna parte del corazón y prodúzse pol taponáu d'una arteria del sistema coronariu, que ye l'encargáu de llevar oxíxenu a esti muérganu. Delles vegaes l'infartu de miocardi produz muerte de sópitu, aunque ye cierto que la tasa de mortalidá mengua añu tres añu gracias a un manexu más curiáu de los factores de riesgu (exemplu, estilu de vida más saludable), a procedimientos médicos de revascularización coronaria y a delles melecines (17). Sicasí, los infartos de miocardi non mortales son responsables de munchos pacientes con una calidá de vida mui menguada. Nesti sen, otra estratexa de medicina molecular qu'amosó dar resultaos bien granibles ye la rexeneración cardiaca, que tien como oxetivu iguar el corazón dañáu xenerando miocardiocitos nuevos. La rexeneración cardiaca básase na idea de que podría ser posible reconstruyir o rexenerar el miocardi adultu dañáu (18).



ARRIBA

Figura 6. Esquema de reprogramación celular p'afalar la rexeneración cardiaca.

L'alministración de factores de reprogramación puxa la tresdiferenciación de fibroblastos a miocardiocitos nel corazón adultu.

Hai múltiples estratexes p'afalar la rexeneración cardiaca. D'ente ellos, dos de les más prometedoros son la proliferación de miocardiocitos residentes y la xeneración de miocardiocitos nuevos por reprogramación celular. La primera d'elles básase nuna conclusión qu'apurció d'una esbilla d'observaciones que se fixeron en modelos animales: la rexeneración cardiaca ocurre de forma natural na natura. Asina tanto organismos mamíferos como non mamíferos tienen la capacidá d'iguar el miocardi dañáu, y esto faise fundamentalmente afalando la proliferación de los miocardiocitos non dañaos. Ye decir, dempués d'un dañu (por exemplu, un infartu de miocardi) hai un número determináu de células del corazón que muerren, lo que ye dañino pal funcionamientu normal del muérganu. Poro, los miocardiocitos que nun se dañaron entamen a proliferar y son a reconstruyir completamente'l corazón. Agora bien, los humanos adultos nun tenemos esta capacidá, y dempués del dañu lo

qu'asocede ye un procesu de reparación caracterizáu pola xeneración d'una marca de coláxenu. El texíu íguase, pero nun se recupera la funcionalidá. Asina, el reactivar la proliferación de miocardiocitos y la capacidá rexeneradora nel corazón adultu diba suponer un avance clínicu bultable. Nesti sen, demostróse que'l remanentiendu de la espresión de delles proteínas que controlen el ciclu celular, la invasión cardiaca y dellos factores solubles, ente otros, controlen la proliferación de miocardiocitos adultos.

La segunda estratexa pa promover la rexeneración cardiaca básase nel conceutu de reprogramación celular, ye decir, el procesu de convertir unes células en otres distintes. Existen munchísimas modalidaes de reprogramación celular, pero, nel casu de la rexeneración cardiaca, una de les más interesantes ye la tresdiferenciación direuta de fibroblastos a miocardiocitos (Figura 6). Los fibroblastos son unes células relativamente abundantes nel corazón, y n'otros

El descubrimientu de procesos biolóxicos nuevos, el desendolcu de recién y posterior abaratamientu de delles teunoloxíes fixeron que la biomedicina [qu'ataca non los síntomas, sinón les causes moleculares de les enfermedaes] se convirtiere nuna auténtica revolución bioteunolóxica

muérganos, y que tienen la función de producir la matriz extracelular y dar sofitu a los miocardiocitos. La idea de la tresdiferenciación básase en mandase de factores de trescripción específicos de miocardiocitos, unes proteínes que controlen los programes xenerales d'espresión de xenos, pa introducilos en fibroblastos y forciar la so tresformación en miocardiocitos (19). Emplegando esta estratexa consiguiéronse resultaos prometedores con modelos *in vitro* qu'agora tán probándose en mures y otros modelos *in vivo* col envís de, nun futuru, poder entamar les primeres pruebes en pacientes humanos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVES DE FUTURU

El descubrimientu de procesos biolóxicos nuevos y el desendolcu de recién y posterior abaratamientu de delles teunoloxíes fixeron qu'una disciplina nueva, la biomedicina, apaeciera y esposigara aína hasta convertise nuna auténtica revolución bioteunolóxica. La biomedicina emplega ferramientes moleculares y celulares

p'atacar non los síntomas, sinón les causes moleculares de les enfermedaes. La mayor parte del corpus de conocimientu de la biomedicina vien de la investigación básica, pero'l so oxetivu cimeru ye apurrir más y meyores tratamientos a la práctica clínica de diario. Pa consiguir esto ye menester más investigación, pa que terminen de xorrecer estes aproximaciones terapéutiques d'un xeitu eficaz y seguru. Por exemplu, en munchos casos, faise necesario usar virus modificaos p'alministrar ADN o ARN a les células diana. Poro, ye importante pescanciar cualesquier riesgu sanitariu seriú, deriváu del emplegu d'estos microorganismos, al envís de nun facer promeses de curación baleres. En resume, los nuevos tratamientos moleculares representen, ensin dulda, el futuru terapéuticu de los pacientes cardiovasculares y musculares. Un futuru onde nun va haber enfermedaes sinón enfermos, onde s'acolumbren les malures dende un puntu de vista molecular y onde la medicina personalizada seya la norma y non la esceición.

Agradecimientos

A José Cabrera pola ayuda na preparación de les figures.

Referencies bibliográfiques

1. Cui M, et al. Genetic and epigenetic regulation of cardiomyocytes in development, regeneration and disease. *Development*. 2018; 145(24).
2. Bang ML, et al. Understanding the molecular basis of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2022; 322(2): H181-H233.
3. Veeder JA, et al. Chemotherapy-associated cardiomyopathy: Mechanisms of toxicity and cardioprotective strategies. *Pharmacotherapy*. 2021; 41(12): 1066-80.
4. McKenna WJ, Judge DP. Epidemiology of the inherited cardiomyopathies. *Nat Rev Cardiol*. 2021; 18(1): 22-36.
5. Morton SU, et al. Genomic frontiers in congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022; 19(1): 26-42.
6. Chemello F, et al. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J Clin Invest*. 2020; 130(6): 2766-76.
7. Cannata A, et al. Gene Therapy for the Heart Lessons Learned and Future Perspectives. *Circ Res*. 2020; 126(10): 1394-414.
8. Kieserman JM, et al. Current Landscape of Heart Failure Gene Therapy. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8(10): e012239.
9. von Appen A, et al. LEM2 phase separation promotes ESCRT-mediated nuclear envelope reformation. *Nature*. 2020; 582(7810): 115-8.
10. Vietri M, et al. Unrestrained ESCRT-III drives micronuclear catastrophe and chromosome fragmentation. *Nat Cell Biol*. 2020; 22(7): 856-67.
11. Abdelfatah N, et al. Characterization of a Unique Form of Arrhythmic Cardiomyopathy Caused by Recessive Mutation in LEMD2. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 ;4(2): 204-21.
12. Caravia XM, et al. Loss of function of the nuclear envelope protein LEMD2 causes DNA damage-dependent cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2022; In press.
13. Mojica FJ, Rodriguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J*. 2016; 283(17): 3162-9.
14. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346(6213): 1258096.
15. Ledford H, Callaway E. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*. 2020; 586(7829): 346-7.
16. Liu N, Olson EN. CRISPR Modeling and Correction of Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2022; 130(12): 1827-50.
17. Khera R, et al. Contemporary Epidemiology of Heart Failure in Fee-For-Service Medicare Beneficiaries Across Healthcare Settings. *Circ Heart Fail*. 2017; 10(11).
18. Sadek H, Olson EN. Toward the Goal of Human Heart Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2020; 26(1): 7-16.
19. Garry GA, et al. Direct reprogramming as a route to cardiac repair. *Semin Cell Dev Biol*. 2022; 122 :3-13.