



Revisión

El sistema pHLIP como vehículo de microRNA en el riñón

Verónica Miguel^{a,*}, Carlos Rey^a, José Luis Aceña^b, Francisco Maqueda^b,
Carlos Fernández-Hernando^c, Diego Rodríguez-Puyol^d, Juan J. Vaquero^b
y Santiago Lamas^a

^a Programa de Procesos Fisiológicos y Patológicos, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, España

^b Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Instituto de Investigación Química Andrés M. del Río (IQAR), Universidad de Alcalá, IRYCIS, Alcalá de Henares, Madrid, España

^c Integrative Cell Signaling and Neurobiology of Metabolism Program, Department of Comparative Medicine and Department of Pathology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, Estados Unidos

^d Department of Medicine and Medical Specialties, Research Foundation of the University Hospital Príncipe de Asturias, IRYCIS, Alcalá University, Alcalá de Henares, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de marzo de 2020

Aceptado el 20 de mayo de 2020

Palabras clave:

Fibrosis renal

miRNA

PNA

pHLIP

R E S U M E N

Los microRNA (miRNA) son ARN endógenos de pequeño tamaño que regulan la expresión génica a través de la represión postranscripcional de sus ARN mensajeros diana. El estudio de los cambios en la expresión de ciertos miRNA en el riñón ha proporcionado evidencias sobre su papel patogénico y potencial terapéutico en nefrología. En esta revisión proponemos un abordaje de nanotecnología basado en la unión de análogos o inhibidores de miRNA formados por ácidos peptid nucleicos (PNA) a péptidos con una estructura transmembrana que es sensible a pH bajo, denominada pHLIP (del inglés *pH [low] insertion peptide*), apoyándonos en el concepto de que el pH ácido del microambiente tubular renal puede facilitar la concentración y la distribución del complejo pHLIP-PNA en este órgano. En este contexto hemos demostrado por primera vez que la administración dirigida de inhibidores de miR-33 con el sistema pHLIP previene eficazmente del desarrollo de fibrosis renal, abriendo las puertas de esta tecnología a nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de enfermedades renales.

© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The pHLIP system as a vehicle for microRNAs in the kidney

A B S T R A C T

MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous RNAs that regulate gene expression through post-transcriptional repression of their target messenger RNAs. A study of changes in expression of certain miRNAs in the kidney has supplied evidence on their pathogenic role and therapeutic potential in nephrology. This review proposes a nanotechnology approach based on the binding of analogs or inhibitors of miRNAs formed by peptide nucleic acids

Keywords:

Renal fibrosis

miRNAs

PNAs

pHLIP

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vmiguel@cbm.csic.es (V. Miguel).

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.05.007>

0211-6995/© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(PNAs) to peptides with a transmembrane structure sensitive to a low pH, called pHLIPs (pH [low] insertion peptides). The review draws on the concept that an acidic pH in the microenvironment of the renal tubule may facilitate concentration and distribution of the pHLIP-PNA complex in this organ. In this context, we have demonstrated for the first time that targeted administration of miR-33 inhibitors with the pHLIP system effectively prevents the development of renal fibrosis, thus opening up this technology to new strategies for diagnosis and treatment of kidney diseases.

© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conceptos clave

- Los pHLIP son péptidos cortos, sensibles a pH, capaz de insertarse en la membrana plasmática en ambientes extracelulares acídicos, permitiendo liberar en el interior celular moléculas unidas a su extremo C-terminal.
- Los PNA son los análogos estructurales estables de ribonucleótidos más empleados en el uso de los ARN no codificantes como herramientas terapéuticas.
- Desarrollado con finalidad antitumoral, el anclaje de PNA al sistema pHLIP surge como una nueva tecnología para el transporte y distribución específica de antagomiRNA en tejido renal.

Introducción

Los microRNA (miRNA) son una familia de pequeños ARN no codificantes de 20-25 nucleótidos de longitud que reprimen la traducción y/o inducen la degradación de sus ARN mensajeros (ARNm) diana mediante su unión a secuencias complementarias en la región 3' UTR¹. En 1993 se describió el primer miRNA, Lin-4, procedente de *Caenorhabditis elegans*, y no fue hasta el año 2000 cuando se descubrió el primer miRNA procedente de mamífero, let-7. En la actualidad se han llegado a describir más de 1.982 miRNA en todo el genoma humano. La habilidad de un único miRNA de regular cientos de ARNm les confiere la capacidad de modular la expresión de más del 60% de los genes codificantes de proteínas (mirbase), interviniendo en una gran variedad de procesos celulares y fisiológicos, como ciclo celular, proliferación, apoptosis y metabolismo².

Diversos estudios funcionales realizados durante las dos últimas décadas han demostrado que las alteraciones en la expresión de miRNA pueden estar implicadas en el desarrollo de patologías como enfermedades metabólicas, fibrosis y cáncer³. Por ello, resulta de interés el desarrollo de estrategias que permitan utilizar los miRNA como dianas terapéuticas o biomarcadores, ya que pueden ser secretados a los fluidos corporales. La manipulación de sus niveles es uno de los aspectos más candentes en la investigación biomédica actual. Las estrategias más utilizadas para ello son el uso de agonistas (*mimics*), miRNA sintéticos de doble cadena con modificaciones

químicas que favorecen su estabilidad y la captación celular para fines de sobreexpresión, así como el uso de antagomiR (*anti-miR*), consistentes en oligonucleótidos (secuencias cortas de nucleótidos) modificados que se unen al miRNA específico inhibiéndolo⁴. En estudios iniciales, en los que se intentó la administración de estas moléculas de forma sistémica o local, se observó que estas eran degradadas en el torrente sanguíneo, obteniendo una baja distribución en los distintos tejidos⁵. Por ello se han desarrollado diversas estrategias para mejorar la estabilidad de miRNA sintéticos e inhibidores y facilitar su transporte a las células empleando diferentes vectores, principalmente de tipo vírico, liposómico o basado en nanopartículas⁴. El empleo de oligonucleótidos modificados químicamente es una de estas estrategias. Así, los antagomiR, moléculas diseñadas para el silenciamiento de miRNA, son oligonucleótidos sintéticos que poseen un grupo esteroil (colesterol) que permite su entrada en las células y metilaciones del grupo 2'-hidroxilo de las ribosas. Esta modificación química se encuentra comúnmente en ARN de pequeño tamaño en plantas y presenta un efecto protector frente a la degradación⁶. Krutzfeldt et al.⁷ consiguieron la inhibición completa de mir-122 en el hígado tras tres administraciones intravenosas de un antagomiR. Otras moléculas sintéticas empleadas son los *locked-nucleic-acid-modified oligonucleotides* (LNA), moléculas sintéticas formadas por nucleótidos de ARN modificado con un puente extra que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4', y los ácidos peptidonucleicos (*peptide nucleic acids* [PNA]), polímeros sintéticos a los que se le ha sustituido los monosacáridos propios de los ácidos nucleicos por una estructura pseudopeptídica. Estas moléculas presentan una alta afinidad al miRNA diana, así como una alta estabilidad y distribución en ratón en gran variedad de tejidos. Sin embargo, carecen de la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica y no poseen especificidad de tejido (fig. 1)^{8,9}. A diferencia de los inhibidores de miRNA, las modificaciones químicas no son susceptibles de ser aplicadas en oligonucleótidos agonistas de miRNA, ya que podrían modificar el perfil de sus genes diana¹⁰. Por ello, las estrategias más empleadas para la dispensación de miRNA miméticos involucran el uso de nanopartículas lipídicas, vectores virales o aptámeros, siendo estos últimos oligonucleótidos de cadena simple que pueden interactuar con receptores presentes en la superficie de las células, permitiendo la entrada del miRNA *mimic* al que va anclado^{11,12}. Estas estrategias presentan una alta estabilidad, pero la distribución a los tejidos es limitada, siendo los pulmones, el hígado, las células endoteliales y diversos tumores

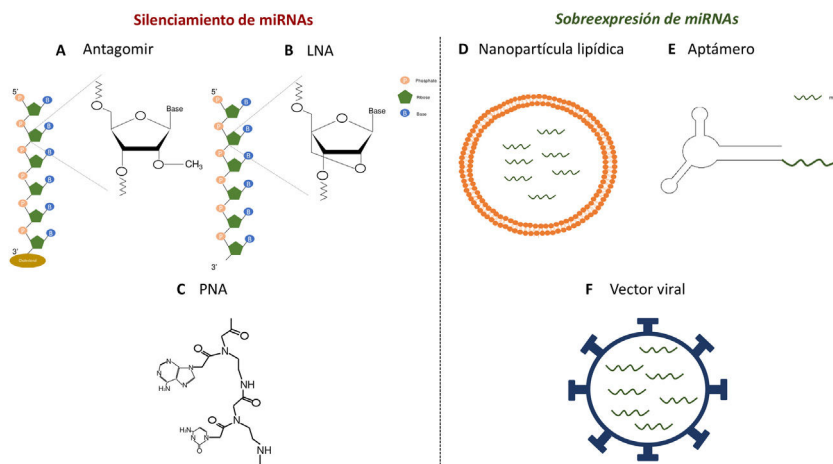


Figura 1 – Estrategias para la administración de antagonistas o agonistas de miRNA in vivo. A-C) Estructura química de los análogos de ácidos nucleicos: antagomiR (A), LNA (B) y PNA (C), empleados como estrategias de silenciamiento de miRNA in vivo. D-F) Modelos esquemáticos de nanopartículas lipídicas (D), aptámeros (E) y vectores virales (F) para la dispensación de miméticos in vivo.

los que presentan un mayor grado de expresión de los miRNA mimics suministrados.

En el riñón, la expresión alterada de diversos miRNA se ha relacionado con el desarrollo de diversas patologías. Ejemplo de ello son miR-214 y miR-21, cuya expresión aumenta en modelos de daño renal^{13,14}. Por el contrario, una disminución de la expresión de miR-17 y miR-200 se relaciona con la enfermedad renal poliquística^{15,16}, mientras que la expresión de miR-29 es suprimida por TGF- β ¹⁷, promoviendo el desarrollo de fibrosis renal. En trabajos recientes se inhibió la expresión de miRNA en riñones de ratones con nefropatía diabética mediante la administración sistémica de antagomirs o LNA¹⁸⁻²⁰. En el caso de miR-21, un miRNA implicado en la fibrogénesis de diferentes órganos, se están estudiando en fase clínica II inhibidores terapéuticos de miR-21 basados en oligonucleótidos modificados químicamente para el tratamiento de la enfermedad de Alport²¹. Asimismo, en otros estudios se restauraron los niveles de microRNA en el riñón. Se consiguió incrementar la expresión renal de miR-9-5p en modelos de ratón mediante la dispensación retroorbital de vectores virales y de miR-146a mediante nanopartículas^{22,23}. Sin embargo, la principal limitación de las estrategias empleadas fue la baja distribución de los oligonucleótidos en el tejido renal. Además, debido a que los miRNA regulan cientos de ARNm involucrados en gran variedad de procesos presentes en diferentes tipos celulares y tisulares, la administración sistémica, no específica de tejido, de un miRNA o un antagomiR podría tener importantes efectos secundarios no deseados⁵. Por ello, resulta de gran interés el desarrollo de estrategias que permitan el incremento de la distribución de antagomiR o miRNA miméticos de forma específica en el riñón que posibilite nuevas vías de tratamiento en patología renal.

Síntesis y aplicaciones de los PNA

Los PNA son compuestos de origen sintético que contienen una secuencia de nucleobases fijada sobre una cadena de

poli-N-(2-aminoetil)glicina²⁴. La complementariedad de las bases del PNA con aquellas de un ADN o ARN permite la formación de dímeros estables, con amplias aplicaciones en la regulación de la funcionalidad de los ácidos nucleicos (expresión génica, terapias antisentido) o como herramientas de diagnóstico (detección de ácidos nucleicos)²⁵.

La preparación de PNA se lleva a cabo habitualmente por medio de técnicas de síntesis en fase sólida a través de la formación de enlaces peptídicos, de manera análoga a los péptidos convencionales e incluso a través de procedimientos automatizados. Los monómeros requeridos para la síntesis están disponibles comercialmente, conteniendo cada una de las cuatro bases canónicas y grupos protectores apropiados como *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). Estos grupos protectores de aminas presentes en el extremo N-terminal y en la cadena lateral de los monómeros de PNA son necesarios para la síntesis en fase sólida de sus polímeros, basada en la incorporación de monómeros de PNA al extremo N-terminal del polímero naciente anclado a un soporte, a través de ciclos de reacciones alternas de desprotección y acoplamiento. Así mismo, estos grupos protectores son necesarios para evitar reacciones secundarias no deseadas con las diversas cadenas laterales de aminoácidos. El sistema de protección N-terminal Boc se elimina con ácido trifluoroacético (TFA), formando un grupo amino cargado positivamente, que se neutraliza y acopla al aminoácido activado entrante. La eliminación final del péptido del soporte sólido se produce simultáneamente a la desprotección de la cadena lateral usando fluoruro de hidrógeno anhidro. Este es el enfoque elegido para sintetizar péptidos que contienen restos sensibles a las bases, ya que en el caso del sistema Fmoc la desprotección utiliza una base, típicamente 20-50% de piperidina en N,N-dimetilformamida, mientras que la escisión ácida final se produce en condiciones ácidas más suaves (TFA).

La adecuada elección de resinas, espaciadores (*linkers*) y disolventes, así como el empleo de técnicas como la irradiación por microondas, permiten el acceso a cadenas de PNA

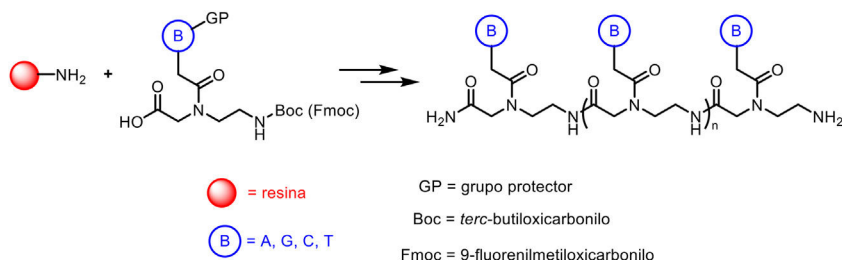


Figura 2 – Síntesis en fase sólida de PNA. Este proceso conlleva la formación de enlaces peptídicos de los monómeros de PNA conteniendo una de las cuatro bases canónicas y grupos protectores apropiados como Boc o Fmoc. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

que contienen 15-20 monómeros, por lo general con buenos rendimientos y elevadas purezas (fig. 2).

La principal ventaja de las cadenas de PNA en comparación con los correspondientes oligonucleótidos es su elevada estabilidad metabólica frente a la acción tanto de las nucleasas como de las proteasas. Sin embargo, los PNA exhiben una pobre permeabilidad debido a su carácter esencialmente lipófilo, a lo que también contribuye su flexibilidad conformacional. Para solventar esta limitación se han descrito distintas modificaciones en la estructura de los PNA, tanto en la cadena polipeptídica (introducción de sustituyentes adicionales y/o elementos de quiralidad) como en las propias bases nitrogenadas, con el propósito de disminuir la movilidad conformacional y a su vez mejorar la afinidad en la formación de estructuras híbridas con ARN o ADN. Recientemente se ha propuesto también la introducción selectiva de aminoácidos intercalados en un esqueleto de PNA, de manera que la información que codifican sea utilizada como potencial elemento de autoensamblaje estructural. De esta forma, la incorporación de cadenas hidrofóbicas o hidrofílicas de aminoácidos permitiría modular la estructura secundaria del esqueleto de PNA y la formación de agregados anfipáticos micelares, controlando la solubilidad y la permeabilidad celular de estas cadenas de PNA. Así mismo, la unión específica de moléculas de ADN o ARN con secuencia complementaria a la codificada por las cadenas de PNA podría permitir un desensamblaje controlado de estas estructuras²⁶.

Sistema de pH (low) insertion peptide (pHLIP)

Hasta la fecha, la manera más eficaz de lograr una buena permeabilidad celular en un PNA implica la formación de conjugados. En este contexto, determinados compuestos peptídicos denominados péptidos de penetración celular (CPP) presentan la capacidad de atravesar las membranas celulares utilizando procesos como la translocación directa o la endocitosis, y han sido utilizados con éxito en el transporte de PNA²⁷. Otras posibilidades estudiadas han sido los complejos de PNA con liposomas o su vehiculización soportados sobre óxido de grafeno²⁸. Los CPP son péptidos de 6-30 aminoácidos, mayoritariamente de carga positiva y naturaleza anfipática, que permiten la internalización celular de macromoléculas, polipéptidos y oligonucleótidos con alta eficacia y baja toxicidad. Algunos CPP derivan de biomoléculas naturales (p.ej., Tat, derivada de una proteína del VIH-1), mientras

que otros (p.ej., poliarginina) se obtienen por métodos sintéticos. Las uniones entre los CPP y las moléculas transportadas pueden ser de naturaleza covalente (conjugación con sulfato de sulfosuccinimidilo, carbodiimida y tiol-amina) o no covalente (interacciones biotina-estreptavidina, electrostáticas y de afinidad con metales)²⁹. Directamente relacionada con los CPP está la nanotecnología basada en péptidos con una estructura transmembrana que es sensible a pH ácido, denominada pHLIP (del inglés *pH [low] insertion peptide*). Estos contienen una secuencia de 35-40 aminoácidos, y no suelen presentar estructura secundaria definida en medio neutro o ligeramente básico. A un pH más ácido, los residuos del pHLIP protonables y los cargados negativamente se vuelven neutros, aumentando la hidrofobicidad global del pHLIP y, como consecuencia, su afinidad por la membrana plasmática. Además, la presencia de residuos hidrofóbicos en la región central de secuencia posibilita que a este pH se forme una estructura helicoidal que es capaz de intercalarse en la membrana celular de manera unidireccional. Por tanto, la conjugación de determinadas moléculas, entre las que se encuentran los antagomiR, al extremo C-terminal en un residuo de cisteína o lisina de estos péptidos, mediante un puente disulfuro (estable fuera de la célula, pero lábil en el citoplasma debido al ambiente reductor), permite su transporte selectivo a través de membranas celulares de manera no endocítica, en función de pequeños cambios en la acidez extracelular. La cinética de inserción en la membrana puede modularse por la secuencia de aminoácidos del péptido. Tras la liberación de la molécula, al exponerse el residuo del extremo C-terminal del pHLIP al pH normal de la célula, este se desprotona, provocando el desanclaje del péptido de la membrana (fig. 3)³⁰.

El sistema de pHLIP fue desarrollado con finalidad antitumoral explorando la propiedad del entorno ácido de ciertos tumores para liberar en el interior celular moléculas de PNA³¹. En este trabajo se describe cómo se consiguió un transporte dirigido eficaz de anti-miR-155 hacia un tumor linfático murino, constituyendo un hito importante en la terapia antitumoral basada en miRNA. Además, se ha observado una acumulación elevada de este complejo en tejidos con inflamación y en el riñón en la misma magnitud que en los tumores. Este último presenta una tasa alta de catabolismo para proteínas de bajo peso molecular y ciertas regiones ácidas en el intersticio tubular cortical^{32,33}. Por otra parte, la homeostasis ácido-base en mamíferos superiores exige la formación de una orina ácida (pH ~ 5). Ello se logra a través de la reabsorción del bicarbonato en el túbulo proximal y la secreción

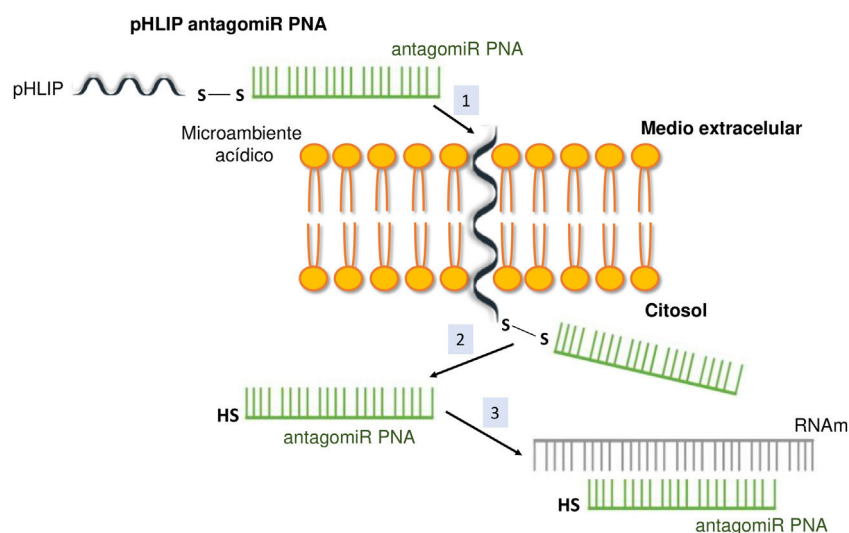


Figura 3 – Vehiculización de PNA empleando un péptido de penetración celular (pHLIP). 1. Inserción del pHLIP en la membrana celular, dejando el extremo C-terminal en el citosol. 2. Rotura del enlace disulfuro gracias al entorno reductor del interior celular. 3. Hibridación del PNA con el ARNm diana.

de protones (H^+) a lo largo de la nefrona, en particular en las regiones del túbulo proximal y distal y el túbulo colector, mediante el concurso de transportadores e intercambiadores con especificidad celular. Ello da lugar a un fluido tubular ácido y a un tejido circundante túbulo-intersticial ácido en algunas regiones del riñón³⁴. La presumible ventaja biológica proporcionada por el microambiente ácido de determinadas estructuras renales nos llevó a proponer un abordaje de nanotecnología basado en la unión de antagomiR a péptidos pHLIP para vehicularlos de manera selectiva al tejido renal en el tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC). De este modo, se reduciría la eliminación de estas moléculas por vía hepática, facilitando su entrada en las células mediante una ruta no endocítica o mediada por receptores. Además, tanto el hecho de que la inflamación crónica está íntimamente relacionada con el desarrollo y posterior progresión de la fibrosis renal, como los cambios metabólicos asociados que sufren los fibroblastos renales por los que pasan de obtener energía por la vía de oxidación de los ácidos grasos a hacerlo mediante un proceso glicolítico, conferiría una ventaja añadida al uso del sistema pHLIP³⁵⁻³⁷.

Nosotros hemos aplicado por primera vez el sistema de pHLIP para la administración dirigida al riñón de inhibidores de miR-33 con el fin de determinar si la inhibición de este microRNA, clave en el metabolismo lipídico, podría ser una estrategia terapéutica eficaz para prevenir el daño renal³⁸. En este trabajo demostramos la acumulación renal y la captación de las construcciones de pHLIP fluorescentes en células tubulares primarias, induciendo la expresión de genes diana de miR-33 implicados en la oxidación de ácidos grasos. De manera similar a lo observado en animales miR-33^{-/-}, el tratamiento con construcciones de anti-miR-33^{pHLIP} previno la inducción de genes implicados tanto en la fibrosis como en la inflamación en el riñón después del tratamiento en los modelos de obstrucción unilateral del uréter y de nefropatía inducida por ácido fólico, así como el deterioro de la función

renal. Esta prueba de concepto apoya el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a reducir el potencial papel pro-fibrogénico de los miRNA en la enfermedad renal (fig. 4).

Retos y perspectivas

Los PNA son los análogos estructurales estables de ribonucleótidos más empleados en el uso de los ARN no codificantes como herramientas terapéuticas^{24,39}. La vehiculización de moléculas de PNA con el sistema pHLIP *in vivo* podría representar un método eficiente y seguro, superando las principales limitaciones de las estrategias de regulación génica basadas en el uso de los miRNA, como son la especificidad de órgano y la biodisponibilidad de los productos administrados³¹. Se ha estudiado que el sistema pHLIP dispensa eficazmente PNA de hasta ~7 kDa de manera dependiente de pH, reduciéndose esta limitación con moléculas más hidrofóbicas⁴⁰. Su acumulación en el riñón lo sitúa como una herramienta terapéutica potente y novedosa para la prevención o el tratamiento de múltiples patologías relacionadas con este órgano³⁸. Sin embargo, deben señalarse algunas limitaciones. En estudios con animales se ha observado que la modificación del pH del agua de bebida regula la presencia del péptido en el riñón. De esta forma, la administración de bicarbonato reduce su acumulación en este órgano, lo que limitaría la modulación por pH en esta localización^{32,41}. Además, el hecho de que este péptido esté formado por D-aminoácidos en vez de L-aminoácidos hace que presente la misma afinidad por la bicapa lipídica pero reduce su presencia en el riñón, posiblemente debido a su mayor estabilidad en la sangre³². Así mismo, un estudio reciente sugiere que un tamaño mayor de las construcciones reduce su penetración a través de la barrera de filtración glomerular. Una menor velocidad en la cinética de inserción en la membrana también reduce la probabilidad de que se concentren en el tejido renal y se excreten por la orina⁴⁰.

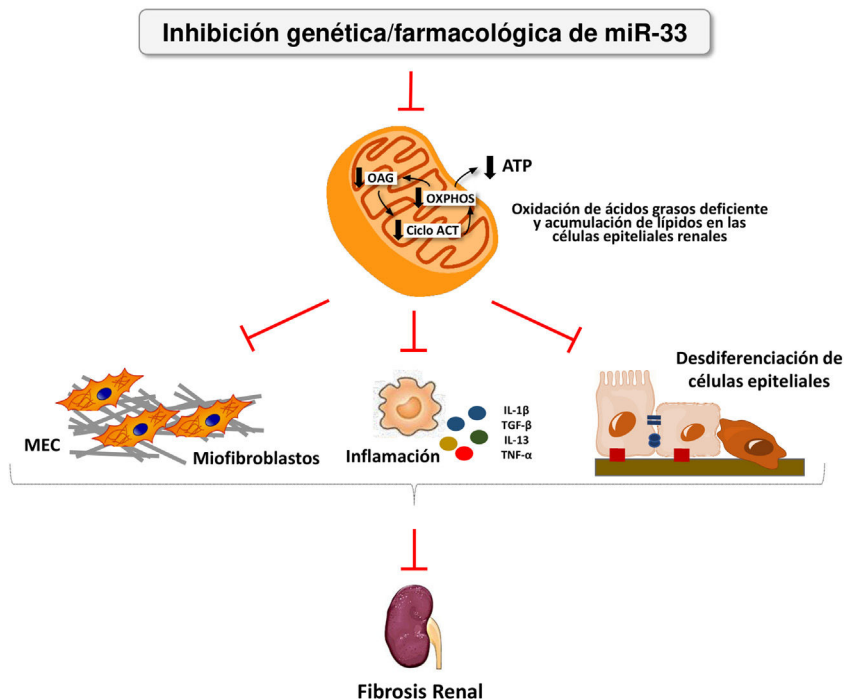


Figura 4 – miR-33 como nuevo regulador del metabolismo lipídico durante la fibrosis renal. La pérdida de miR-33 mejora la oxidación de ácidos grasos, previene la desdiferenciación de las células renales epiteliales y la acumulación de matriz extracelular, atenuando la fibrosis renal.

ATP: adenosín trifosfato; Ciclo ACT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; MEC: matriz extracelular; OAG: oxidación de ácidos grasos; OXPHOS: fosforilación oxidativa.

Si bien esta metodología ha sido optimizada para antagonizar miR, no se ha descrito ningún obstáculo a priori para desarrollar su uso con miRNA, ya que la distribución del complejo PNA mediante pHLIP no parece afectarse por la secuencia nucleotídica. Además, este sistema presenta una serie de propiedades que le otorgan versatilidad. Permite el anclaje a moléculas fluorescentes con el fin de monitorizar la distribución del péptido⁴², mientras que la variación de su secuencia permite el ajuste de sus propiedades farmacocinéticas y sus células diana. La translocación del péptido es rápida (segundos a minutos) y dependiente del pH y de la concentración, la cual se reduce con el empleo de estos conjugados en comparación con el uso de antagonistas de miRNA de manera libre^{7,43}. En los estudios realizados se han empleado una administración intravenosa de las construcciones anti-miR-33^{pHLIP} a una concentración de 1 mg/kg de peso corporal en 4 dosis para el tratamiento de la fibrosis renal³⁸ y en 2 dosis para el tratamiento del linfoma³¹. En otros ensayos enfocados al diagnóstico se emplearon péptidos pHLIP unidos a una molécula fluorescente a concentraciones de 1 μ M por vía intravenosa para la detección de regiones isquémicas en el miocardio⁴⁴ e intraperitoneal a 100 μ M en 3 dosis en caso de infección pulmonar⁴⁵. Se han llegado a realizar estudios de toxicidad con concentraciones de hasta 4 mg/kg de peso corporal con construcciones pHLIP llevando a cabo una monitorización de los animales durante 2 meses, en los que no se detectaron cambios fisiológicos o de comportamiento³². El pHLIP, en comparación con los péptidos que penetran en las células, permanece en la membrana celular después de la

inserción, translocando un extremo al citoplasma y dejando el otro extremo en el espacio extracelular. Por lo tanto, el péptido pHLIP posee capacidades de entrega dual: no solo puede inyectar y liberar moléculas en el citoplasma, sino que también permite el transporte a la membrana celular de moléculas hidrofóbicas unidas al extremo N-terminal del pHLIP⁴⁶.

Aunque prometedor, el empleo del sistema pHLIP como herramienta en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la patología renal es todavía un reto, siendo necesarios más estudios experimentales de vehiculización de PNA en modelos específicos de enfermedad renal, un estudio detallado de su farmacocinética y su farmacodinámica, así como su introducción en ensayos clínicos con aplicación a los miRNA más explorados. En el desarrollo de esta aplicación los aspectos más limitantes se relacionan con la especificidad y la sensibilidad del sistema. Entre ellos se sitúa la acumulación no dirigida hacia tejidos con un microambiente ácido inducido por situaciones de isquemia, inflamación o infección^{44,45}. Dado que pequeños cambios de pH pueden dar lugar a un efecto biológico significativo, alterando las funciones y la supervivencia celular, es necesario realizar un ajuste más preciso de las propiedades químicas de este sistema de transporte para mejorar su sensibilidad⁴⁷. Otro aspecto a tener en cuenta en su diseño es el hecho de que a menudo el pH es más bajo en las superficies de las células en comparación con el pH del espacio extracelular⁴⁸, así como el diferente nivel de acidificación de las diferentes regiones del riñón y la dinámica de cambio de pH en la transición de tejido renal sano a dañado, particular de cada tipo de lesión^{49,50}. Así, los microambientes

hipóxicos o los cambios en el metabolismo celular en tejidos dañados con frecuencia promueven cambios en la acidificación del ambiente extracelular, de modo que la acidosis podría ser también un marcador útil para el diagnóstico por imagen de diferentes estados de enfermedad, incluida la renal, empleando el sistema pHLIP acoplado a moléculas fácilmente detectables³³.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), SAF2012-31388 (SL), SAF2015-66107-R (SL), PI17/01513 (DRP) y CTQ2017-85263-R (JJV), cofinanciados por los Fondos de Desarrollo Regional Europeo, Instituto de Salud Carlos III REDinREN RD12/0021/0009 (SL), RD16/0009/0016 (DRP) y RD16/0009/0015 (JJV), Comunidad de Madrid «NOVELREN» B2017/BMD-3751 (SL, DRP y JJV), Sociedad Española de Nefrología (Fundación Senefro 2017) (SL) y Fundación Renal «Iñigo Alvarez de Toledo» (SL), todas de España. El CBMSO recibe apoyo institucional de la Fundación «Ramón Areces». Este trabajo también fue apoyado por subvenciones del NIH (R35HL135820), la American Heart Association (16EIA27550005) y la Foundation Leducq Transatlantic Network of Excellence in Cardiovascular Research MicroRNA-based Therapeutic Strategies in Vascular Disease (CFH).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses relacionados con los contenidos de este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anglicheau D, Muthukumar T, Suthanthiran M. MicroRNAs: Small RNAs with big effects. *Transplantation*. 2010;90:105-12.
2. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
3. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:203-22.
4. Van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med*. 2014;6:851-64.
5. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: Current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:622-38.
6. Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, et al. The *Drosophila* RNA methyltransferase DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol*. 2007;17:1265-72.
7. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438:685-9.
8. Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C, et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet*. 2011;43:371-8.
9. Fabani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, Lyons PA, Torres AG, Smith KG, et al. Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:4466-75.
10. Matsui M, Prakash TP, Corey DR. Argonaute 2-dependent regulation of gene expression by single-stranded miRNA mimics. *Mol Ther*. 2016;24:946-55.
11. Hussein Kamareddine M, Ghosn Y, Tawk A, Elia C, Alam W, Makdessi J, et al. Organic nanoparticles as drug delivery systems and their potential role in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18, 1533033819879902.
12. Wilner SE, Wengerter B, Maier K, de Lourdes Borba Magalhaes M, Del Amo DS, Pai S, et al. An RNA alternative to human transferrin: A new tool for targeting human cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012;1:e21.
13. Denby L, Ramdas V, Lu R, Conway BR, Grant JS, Dickinson B, et al. MicroRNA-214 antagonism protects against renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:65-80.
14. Denby L, Ramdas V, McBride MW, Wang J, Robinson H, McClure J, et al. miR-21 and miR-214 are consistently modulated during renal injury in rodent models. *Am J Pathol*. 2011;179:661-72.
15. Tran U, Zakin L, Schweickert A, Agrawal R, Döger R, Blum M, et al. The RNA-binding protein bicucullin C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Development*. 2010;137:1107-16.
16. Patel V, Hajarnis S, Williams D, Hunter R, Huynh D, Igarashi P. MicroRNAs regulate renal tubule maturation through modulation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1941-8.
17. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:252-65.
18. Liu Y, Li H, Liu J, Han P, Li X, Bai H, et al. Variations in microRNA-25 expression influence the severity of diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:3627-38.
19. Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:458-69.
20. Kolling M, Kaucsar T, Schauerte C, Hubner A, Dettling A, Park JK, et al. Therapeutic miR-21 silencing ameliorates diabetic kidney disease in mice. *Mol Ther*. 2017;25:165-80.
21. Gross O, Kashtan CE, Rheault MN, Flinter F, Savige J, Miner JH, et al. Advances and unmet needs in genetic, basic and clinical science in Alport syndrome: Report from the 2015 International Workshop on Alport Syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32:916-24.
22. Fierro-Fernandez M, Miguel V, Marquez-Exposito L, Nuevo-Tapióles C, Herrero JI, Blanco-Ruiz E, et al. MiR-9-5p protects from kidney fibrosis by metabolic reprogramming. *FASEB J*. 2020;34:410-31.
23. Morishita Y, Imai T, Yoshizawa H, Watanabe M, Ishibashi K, Muto S, et al. Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3475-88.
24. Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug Chem*. 1994;5:3-7.
25. Saarbach J, Sabale PM, Winssinger N. Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 2019;52:112-24.
26. Swenson CS, Velusamy A, Argueta-Gonzalez HS, Heemstra JM. Bilingual peptide nucleic acids: Encoding the languages of nucleic acids and proteins in a single self-assembling biopolymer. *J Am Chem Soc*. 2019;141:19038-47.
27. Turner JJ, Ivanova GD, Verbeure B, Williams D, Arzumanov AA, Abes S, et al. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:6837-49.
28. Baek A, Baek YM, Kim HM, Jun BH, Kim DE. Polyethylene glycol-engrafted graphene oxide as biocompatible materials

- for peptide nucleic acid delivery into cells. *Bioconjug Chem.* 2018;29:528-37.
29. Huang YW, Lee HJ, Tolliver LM, Aronstam RS. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: Opportunities and challenges. *Biomed Res Int.* 2015;2015:834079.
 30. Reshetnyak YK, Andreev OA, Lehnert U, Engelman DM. Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6460-5.
 31. Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, Pincus Z, Barrera F, Liu C, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. *Nature.* 2015;518:107-10.
 32. Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, Sandugu S, Serra DA, Chichester CO, et al. Mechanism uses of a membrane peptide that targets tumors other acidic tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7893-8.
 33. Andreev OA, Engelman DM, Reshetnyak YK. Targeting diseased tissues by pHLIP insertion at low cell surface pH. *Front Physiol.* 2014;5:97.
 34. Boron WF. Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2368-82.
 35. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:493-503.
 36. Yin XN, Wang J, Cui LF, Fan WX. Enhanced glycolysis in the process of renal fibrosis aggravated the development of chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22:4243-51.
 37. Rabelink TJ, Carmeliet P. Renal metabolism in 2017: Glycolytic adaptation and progression of kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14:75-6.
 38. Price NL, Miguel V, Ding W, Singh AK, Malik S, Rotllan N, et al. Genetic deficiency or pharmacological inhibition of miR-33 protects from kidney fibrosis. *JCI Insight.* 2019;4. E131102.
 39. Ozes AR, Wang Y, Zong X, Fang F, Pilrose J, Nephew KP, et al. Therapeutic targeting using tumor specific peptides inhibits long non-coding RNA HOTAIR activity in ovarian and breast cancer. *Sci Rep.* 2017;7:p894.
 40. Svoronos AA, Bahal R, Pereira MC, Barrera FN, Deacon JC, Bosenberg M, et al. Tumor-targeted, cytoplasmic delivery of large polar molecules using a pH-low insertion peptide. *Mol Pharm.* 2020;17:461-71.
 41. Wesson DE. Dietary HCO₃ reduces distal tubule acidification by increasing cellular HCO₃ secretion. *Am J Physiol.* 1996;271 1 Pt 2:F132-42.
 42. Reshetnyak YK, Yao L, Zheng S, Kuznetsov S, Engelman DM, Andreev OA, et al. Measuring tumor aggressiveness and targeting metastatic lesions with fluorescent pHLIP. *Mol Imaging Biol.* 2011;13:1146-56.
 43. Wijesinghe D, Engelman DM, Andreev OA, Reshetnyak YK. Tuning a polar molecule for selective cytoplasmic delivery by a pH (Low) insertion peptide. *Biochemistry.* 2011;50:10215-22.
 44. Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Sosunov AA, Moshnikova A, Wijesinghe D, Engelman DM, et al. pH (low) insertion peptide (pHLIP) targets ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:82-6.
 45. Li N, Yin L, Thevenin D, Yamada Y, Limmon G, Chen J, et al. Peptide targeting and imaging of damaged lung tissue in influenza-infected mice. *Future Microbiol.* 2013;8:257-69.
 46. Andreev OA, Engelman DM, Reshetnyak YK. Targeting acidic diseased tissue: New technology based on use of the pH (Low) Insertion Peptide (pHLIP). *Chim Oggi.* 2009;27:34-7.
 47. Hashim AI, Zhang X, Wojtkowiak JW, Martinez GV, Gillies RJ. Imaging pH and metastasis. *NMR Biomed.* 2011;24:582-91.
 48. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 2010;14:771-94.
 49. Burke TJ, Malhotra D, Shapiro JI. Factors maintaining a pH gradient within the kidney: Role of the vasculature architecture. *Kidney Int.* 1999;56:1826-37.
 50. Longo DL, Busato A, Lanzardo S, Antico F, Aime S. Imaging the pH evolution of an acute kidney injury model by means of iopamidol, a MRI-CEST pH-responsive contrast agent. *Magn Reson Med.* 2013;70:859-64.