

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA. TRABAJO DE FIN DE GRADO



TERAPIA GÉNICA: PRESENTE Y FUTURO

TUTOR:

Margarita Fernández García De Castro

AUTORES:

Ana Bravo Plaza

Julia De La Chica Liñán

MADRID, 2017

ÍNDICE:

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
3.	OBJETIVOS.....	3
4.	METODOLOGÍA.....	4
5.	DISCURSIÓN Y RESULTADOS.....	4-18
6.	ÉTICA.....	18-19
7.	CONCLUSIONES.....	19
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	19-20

RESUMEN

La terapia génica (TG) puede definirse como la entrega de material genético en las células para lograr un efecto terapéutico. La introducción de genes en dichas células, será llevada a cabo por diversos vectores, que de forma general pueden dividirse en vectores virales o no virales (dependiendo de su naturaleza).

Las enfermedades consideradas como mejores candidatas para desarrollar ese tipo de terapia, son las monogénicas, sin embargo, este recurso terapéutico también utiliza estrategias muy interesantes para encarar el tratamiento de neoplasias e infecciones.

En los últimos años se han realizado numerosos ensayos clínicos aplicando la TG en diversas patologías y, si bien muchos de ellos resultaron no ser eficaces, otros se asociaron con efectos adversos inaceptables y otros muchos mostraron a la TG como una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades como la Inmunodeficiencia combinada severa, la hemofilia o el Alzheimer.

Actualmente se están llevando a cabo varios protocolos de TG muy prometedores en enfermedades tan importantes como el cáncer o la diabetes, entre otras.

Palabras claves: Terapia Génica, vectores, inmunogenicidad, enfermedad monogénica, células diana, mutagénesis, transgén.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La terapia génica puede definirse como la transferencia de material génico a células para conseguir un efecto terapéutico.

La evolución de la terapia génica se relaciona con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, así como los diferentes descubrimientos sobre su estructura, que abrieron las puertas para conocer su funcionamiento. Aunque en 1980, Martin Cline realizó un primer intento fallido (sin autorización previa), de dos enfermos de talasemia empleando esta técnica, no fue hasta 1989 cuando se aprobó el primer protocolo clínico con la inserción de un gen en un ser humano. En 1990, se realizó con éxito el primer ensayo clínico de terapia génica, en una niña de 4 años con inmunodeficiencia combinada severa.

Se tiende a pensar que la TG consiste únicamente en la suplementación genética, para restablecer la funcionalidad de un gen defectuoso. Sin embargo, la TG involucra otras técnicas como la supresión génica. En determinadas ocasiones la expresión de un gen favorece el desarrollo de una enfermedad. En este caso, la introducción de oligonucleótidos antisentido o ribozimas evitan la expresión de dicho gen.

Muchas veces, es la presencia de proteínas mutantes la que interfiere en la función de proteínas normales, conocido como efecto negativo dominante. En este caso la TG se basa en la introducción en la célula de secuencias que codifiquen estas proteínas mutantes para que no interfieran. Otro ejemplo de TG consiste en introducir un “gen suicida” en células neoplásicas o infectadas con un patógeno para que sean destruidas.

Se confirma así, que la TG no consiste únicamente en la introducción de una copia de un gen sano, sino que existen otras muchas tácticas en su uso.^{1,2}

OBJETIVOS:

A lo largo de este trabajo, nuestro objetivo fundamental ha sido conocer la situación actual de la terapia génica, analizando los métodos y vectores empleados, las enfermedades en las que ya ha empezado a introducirse esta terapia, y las implicaciones éticas que todo ello conlleva. Así como, valorar cual es el potencial y las expectativas de futuro para esta novedosa rama terapéutica.

METODOLOGÍA:

Este trabajo ha sido realizado conjuntamente por dos autoras. Se ha dividido el tema en 2 grandes bloques: vectores, estrategias y ética y un segundo bloque de enfermedades, desarrollando cada una de las alumnas uno de dichos bloques. Posteriormente se ha llevado a cabo un trabajo en común para unificar e integrar las diferentes partes.

Para realizar este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos (pubmed, BUCea) utilizando palabras clave como: Terapia génica, Terapia celular, Ética en avances genéticos, Avances en tratamientos de enfermedades genéticas. De todos los artículos encontrados, hemos realizado una primera selección de los 50 con mayor relevancia para nuestro trabajo. Posteriormente, en una segunda selección, hemos elegido los 30 artículos más interesantes y completos para llevar a cabo nuestros objetivos. En la bibliografía únicamente incluimos los 14 artículos que citamos a lo largo del trabajo. Ésta información la hemos completado con la obtenida a partir de libros publicados sobre el tema.

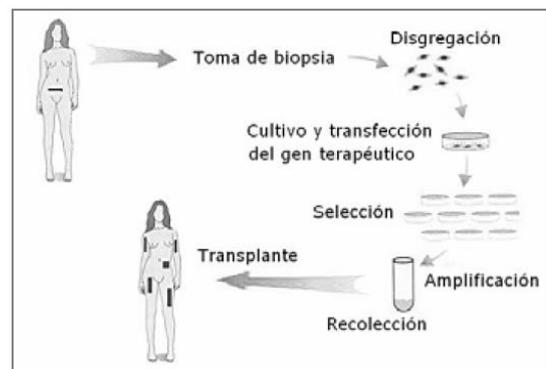
DISCURSIÓN Y RESULTADOS:

ESTRATEGIAS

La transfección de un vector a una célula diana con la intención de que exprese la acción terapéutica puede realizarse mediante Terapia Génica *ex vivo* o mediante Terapia Génica *in vivo*.

Terapia Génica *ex vivo*

Consiste en la extracción de células del propio paciente procedentes de un tejido u órgano. A continuación, tiene lugar una disgregación del tejido y el mantenimiento del cultivo celular *in vitro* y posteriormente se realiza la transfección de las células con el vector adecuado que porta el gen terapéutico.



Las células así transfectadas se seleccionan por su capacidad de expresar el gen terapéutico de forma estable y persistente en el tiempo. Después de amplificarse, se reimplantan en el propio paciente. Esta forma de Terapia Génica es sin duda la más segura para el paciente.²

Terapia Génica *in vivo*

Se basa en la administración de forma sistémica al paciente de la construcción génica constituida por el vector y el gen terapéutico. La forma de transfección suele ser mediante vectores virales. En ocasiones y en función de la patología a tratar, el vector puede ser o no destinado, presentando tropismo tejido-específico. Esto tiene una gran utilidad cuando la enfermedad tiene su origen en un determinado tejido.²



Esta forma de Terapia Génica, aunque más eficaz en la distribución y expresión del gen terapéutico puede conllevar más riesgos para el paciente que en algunos casos puede ser irreversible ya que su administración es sistémica a diferencia de la Terapia Génica *ex vivo* que permite retirar el implante o el injerto.

MATERIAL TERAPEUTICO INTRODUCIDO EN LA CÉLULA

Se pueden introducir en la célula blanco diferentes estructuras constituidas por ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN).^{1,4}

Plásmidos

Son estructuras de ADN de cadena doble que existen en procariotas y en algunos eucariotas. Se emplean como herramientas incorporando un promotor y el gen productor de la proteína deseada. Se los puede considerar como profármacos, ya que, al penetrar en el interior de la célula su secuencia se transcribe y traduce a la proteína que cumple la función terapéutica.

Los mayores inconvenientes que presenta se deben a su rápida degradación y su expresión temporal.

Aptámeros

Son ácidos nucleicos que no existen naturalmente. Se crean sintetizando diferentes cadenas de oligonucleótidos de forma aleatoria, incubándola con las moléculas de interés, hasta encontrar las que presentan mayor afinidad y se amplifican.

Pueden interactuar directamente con las proteínas involucradas en el desarrollo de una enfermedad o con sus factores de transcripción. Presentan un comportamiento similar al de los anticuerpos, pero con mayor especificidad y menos efectos inmunogénicos. Su mayor limitación se encuentra en su corta semivida.

Oligonucleótidos

Son ácidos nucleicos pequeños de cadena simple que, pueden impedir la expresión de una proteína involucrada en el desarrollo de una enfermedad, una vez han penetrado en el interior de la célula. Pueden unirse directamente al gen, impidiendo su transcripción o usarse como oligonucleótidos antisentido uniéndose al ARN mensajero impidiendo su traducción.

Los oligonucleótidos presentan una gran dificultad para llegar al citoplasma o al núcleo de la célula diana con su actividad funcional intacta.

Ribozimas

Son moléculas de ARN que presentan actividad enzimática, es decir, cortan y pegan ARN en sitios específicos. Existen ribozimas naturales, pero también se pueden crear ribozimas sintéticos con la capacidad de dirigir el corte hacia la secuencia específica a tratar.

Presentan la gran ventaja de ser específicas y poco inmunogénicas, sin embargo, son estructuras con baja estabilidad y se encuentran grandes dificultades a la hora de localizar la ribozima con la secuencia contra la cual está dirigida.

ARN de interferencia

La acción del ARN de interferencia es un fenómeno natural que lleva a silenciar la expresión de un determinado gen, por un mecanismo postranscripcional.

Si bien el ARN puede ser degradado por ribonucleasas endógenas en su camino a la célula diana, este efecto puede ser mitigado incrementando su estabilidad en el laboratorio. Este efecto “silenciador” de genes es temporalmente limitado.

VECTORES

Los vectores son aquellos mecanismos que van a llevar a cabo el proceso de transferencia de un material génico a una célula. Al mismo tiempo aseguran su biodisponibilidad intracelular para que puedan ejercer una función biológica.^{1, 2}

De forma general podemos clasificarlos en vectores virales y no virales.

Vectores virales

Los vectores virales son virus modificados para que sin perder su capacidad infectiva no produzcan patología. Conservan su capacidad para introducirse en la célula y para dirigir y expresar un gen exógeno. Si bien los virus son muy eficientes para introducir el material génico, todavía queda mejorar aspectos relacionados a la seguridad de su empleo y a su inmunogenicidad.⁵

Retrovirus

Se generan retrovirus con toda la maquinaria necesaria para su incorporación en la célula diana, pero cuyo material a transferir sea el ácido nucleico terapéutico en lugar del genoma viral. Se replican para dar una cadena doble de ADN que actúa como intermediario.

Adenovirus

La penetración en la célula es mediante un receptor y una vez en el interior se produce la lisis del endosoma, liberando el ADN que contiene. Después el ADN penetra en el núcleo y sin integrarse permanece en forma de episoma extracromosómico, dirigiendo la expresión del gen terapéutico.

Virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) son unos virus muy pequeños y muy simples que no son autónomos. Contienen ADN lineal de cadena sencilla y requieren la coinfección con un adenovirus u otros virus para replicarse, y a diferencia de los adenovirus, sí se integran en el genoma celular del huésped.

Herpesvirus

Otros vectores son los basados en herpes virus y en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o lentivirus. Dos características interesantes de estos virus son: Su utilidad para introducir genes en la célula del sistema nervioso, debido a su carácter neuropático, así como su capacidad de persistir mucho tiempo en dicho tejido nervioso, al mantenerse en estado latente. Su ADN no se va a integrar en el del huésped, pero se mantiene estable y se divide junto al ADN cromosómico.

A continuación, adjuntamos una tabla con las principales características de los diferentes vectores virales:

VECTOR	DIANAS CELULARES	CAPACIDAD CLONACIÓN	DEVENTAJAS	DESVENTAJAS
Adenovirus	Pulmón, tracto respiratorio	7.5 kb	Transfección (introducción de material genético externo en células eucariotas) eficiente, y fácil producción en laboratorio.	Fuerte respuesta inmunitaria y dificultad para repetir la inyección.
Virus adenoasociado	Fibroblastos, células T, otras	4.5 kb	Transfecta muchos tipos celulares, expresión a largo plazo y no hay respuesta inmunitaria.	Pequeño tamaño inserto y dificultad para obtener grandes cantidades.
Retrovirus	Células en proliferación	8 kb	Expresión prolongada, alta eficacia de transducción, tamaño del inserto grande, las proteínas del vector no se expresan en el huésped y sistema muy bien estudiado.	Baja eficiencia de transformación, necesita células en división e integración al azar en el genoma.
Lentivirus	Células madre, células en proliferación	8 kb	Transfección eficiente	Relacionado al VIH

VECTORES NO VIRALES

Los vectores no virales sintéticos se han desarrollado como una alternativa para superar muchos de los problemas de seguridad asociados a los sectores virales.

Estos vectores generalmente no presentan inmunogenicidad pero son menos eficientes a la hora del ingreso del material génico a la célula.

Liposomas

No presentan especificidad para ningún tipo celular y su entrega de material génico es mucho menos eficaz que la mediada por virus. No obstante, algunos liposomas pueden ser dirigidos mediante la modificación de sus lípidos de pared o por su acople a sustancias, o a fragmentos de anticuerpos.

Complejo asialoglicoproteína-polilisina y otros polímeros catiónicos

La polilisina (carga positiva) se une al ADN (carga negativa), mientras que la asialoglicoproteína permite su ingreso a los hepatocitos, por ejemplo. Otros polímeros catiónicos utilizados son la polietiliminina y el quitosano.

Cromosomas artificiales

Pueden transferir grandes segmentos del ADN. Al mantenerse como episoma de forma estable, no se corre el riesgo de mutagénesis insercional. Pueden llevar varias secuencias reguladoras que permitan obtener la expresión histoespecífica del gen.

Transferencia directa de ácidos nucleicos

Pueden lograrse por electroporación (aplicación de una carga eléctrica sobre la membrana plasmática) o por unión a esferas pequeñas que pueden ser acopladas a ligandos específicos que dirijan el material hacia un tejido específico. Estas técnicas pueden aplicarse *ex vivo* o *in vivo*. La entrega de material génico es mucho menos eficaz.

TERAPIA GENICA EN DIFERENTES PATOLOGIAS

Para el tratamiento de las distintas enfermedades se utiliza el tipo de vector más adecuado dependiendo de las características del mismo y de la enfermedad. Los trastornos genéticos considerados los mejores candidatos para aplicar la terapia génica son las enfermedades monogénicas, estas son causadas por un solo gen específico, relativamente sencillo que necesite una

excelente regulación y cuya función no sea absolutamente fundamental para la diferenciación y desarrollo de la línea celular afectada.⁶

Inmunodeficiencia combinada severa.

La inmunodeficiencia combinada severa es una de las enfermedades en la que la terapia génica es ya una opción terapéutica. En esta patología existe una alteración en el gen responsable de la actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA) (rasgo autosómico recesivo), y como consecuencia se acumulan adenosina y 2-desoxiadenosin trifosfato que son tóxicos para los linfocitos T, que son destruidos.

Existe una variante de la enfermedad, llamada inmunodeficiencia combinada severa-X1 (SCID-X1), en la cual el gen afectado es el receptor γ C de varias interleuquinas, y el resultado es un bloqueo de la diferenciación de linfocitos T y células NK. En ambas, el individuo pierde su inmunidad para combatir cualquier patógeno y son letales desde el nacimiento, a no ser que los niños se mantengan en atmósferas estériles y aisladas. El tratamiento consiste en un trasplante de médula ósea (curativo 20-30%) de un hermano HLA compatible idéntico y la sustitución enzimática, mediante inyecciones musculares múltiples y frecuentes.

El objetivo de la terapia génica aplicada a la inmunodeficiencia combinada severa es la transferencia génica de ADA a células madre de médula ósea pluripotenciales. No se han logrado la expresión estable a largo plazo de los genes insertados, por lo que, se estudiaron los linfocitos T como alternativa.

En 1990 se aprobó el primer ensayo de terapia génica con células T, durante el cual, se extrajeron dichas células y se cultivaron para aumentar su número mediante proliferación. Estas células se expusieron a preparaciones de retrovirus con el gen ADA y finalmente fueron reintroducidas. Se incluyó un tratamiento quimioterápico al paciente para eliminar las células madre de su médula ósea antes de restituir las con las células del paciente tratadas *ex vivo*, eliminando así los precursores no tratados y dejando sitio a los nuevos modificados genéticamente. El 70% mostró beneficio clínico sin necesitar la administración de la enzima.

En el caso de la variedad SCID-X1 no es necesario el tratamiento coadyuvante quimioterápico porque los linfocitos T modificados genéticamente desarrollaron una ventaja proliferativa sobre los no modificados.

Como efecto adverso se vio que un 20% de los niños desarrolló leucemias al cabo del tiempo. La mayoría de ellas producidas por la integración del retrovirus. en la región reguladora del gen *Imo2*,

que codifica para la proteína LMO2 (LIM domain only 2), necesaria para el desarrollo hematopoyético. Como medida de seguridad se sustituyeron estos vectores por retrovirales autoinactivados.

Hoy en día, se prefiere el trasplante de médula ósea cuando es posible, si no, se recomienda realizar la terapia génica antes de que el paciente desarrolle alguna consecuencia negativa derivada de la inmunodeficiencia.^{2,6}

Hemofilia.

La hemofilia es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X que consiste en un déficit de alguno de los factores de coagulación. Esta deficiencia se debe a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Dependiendo del factor de coagulación que falta se puede clasificar en hemofilia A (con mayor prevalencia), en la que existe una deficiencia del factor VIII (FVIII) o hemofilia B, con deficiencia del factor IX (FIX). Ambos tipos conllevan a un defecto en la cascada de coagulación.

Actualmente el tratamiento de elección es la infusión de factores exógenos, plasmáticos o recombinantes, para suplir el factor deficitario. Se trata de tratamientos meramente paliativos y no eliminan la causa de la enfermedad. Además, estos tratamientos exigen una inyección periódica e incómoda que aumenta el riesgo de infecciones.

La terapia génica puede representar la cura definitiva. Ésta se basa en transferir al paciente el gen que se encuentra defectuoso para producir por sí mismo el FVIII o IX sin necesidad de inyectarlo. Solo con una pequeña expresión de la proteína deficitaria (>5%) se conseguiría un fenotipo leve de la enfermedad y se eliminaría el riesgo de sangrados espontáneos.

Se han obtenido mayores avances en la investigación de la terapia génica de la hemofilia B, esto es debido a que el FIX es más simple y de menor tamaño que el VIII, permitiendo que sea fácilmente introducido en un virus adeno-asociado.

Los estudios de terapia génica para hemofilia B se centran en la liberación del material genético en musculo esquelético. Se demostró que la utilización de AAV (virus adenoasociados) podía ser viable, aunque nunca se alcanzaron niveles terapéuticos por lo que se cambiaron los ensayos a transferencia génica hepática. Esto es debido a que el FIX es producido por el hígado. Hoy en día ninguno de los pacientes tratados con AAV dirigido al hígado, han desarrollado respuesta inmune frente al factor IX formado. Sin embargo, existe una complicación adicional tras la inyección, la expresión comienza a disminuir y aparecen enzimas que indican daño hepático y en 8 semanas tras la primera inyección el FIX desaparece.

Posteriores estudios utilizaron vectores scAAV8 (self complementary AAV) y demostraron que las enzimas hepáticas solo aparecían con altas dosis de tratamiento. La administración de prednisolona suprimía la respuesta de los linfocitos T CD8+ frente a la cápsida del vector y se vio que la expresión del FIX se situaba alrededor de un 5%. Este es el primer tratamiento satisfactorio, aunque existen otras limitaciones como que a los pacientes con infecciones previas de hepatitis C no pueden ser tratados con la prednisolona. Todavía se está trabajando para aumentar la efectividad.

Además de los anteriores estudios, se realizaron otros con vectores retrovirales en los que se vio su propensión de oncogénesis. Los estudios se centraron en los vectores lentivirales (LV) que disminuían esta preocupación, aunque solo pueden ser utilizados en terapia génica *in vivo*. Es posible inducir la expresión del FIX en hepatocitos usando un vector LV. A diferencia de los vectores AAV la terapia génica hepática con LV no genera tolerancia al transgén, pero la presencia del FIX si genera una respuesta inhibitoria. Aun así, la preocupación más importante en cuanto a seguridad es el riesgo de mutagénesis insercional y el riesgo de aparición de tumores.

La apuesta en hemofilia está en una TG *ex vivo* sobre células fácilmente extraíbles de forma mínimamente invasiva e incruenta, fácilmente transfectables por métodos no virales y cómodamente reimplantables que, por su capacidad de perpetuar la transgénesis, se logren niveles terapéuticos y periodos de expresión moderados. Una expresión de solo unos meses ya representa un gran éxito para un paciente que se ha de inyectar factor exógeno, dos o tres veces por semana.

La terapia génica no viral también ha sido investigada. El proceso se puede realizar *in vitro* transfiriendo un liposoma mediante electroporación o *in vivo* con una inyección hidrodinámica de un alto volumen de una solución intravenosa de ADN, que introduce el plásmido con el trasposón (ADN capaz de moverse de una localización del cromosoma a otra). La investigación en TG se ha centrado en dos transposones: piggyBac y Sleeping Beauty.

Por otro lado, en los estudios de la terapia génica para la hemofilia A existe un menor progreso, los vectores descritos pueden utilizarse también para la hemofilia A, pero la expresión endógena del FVIII es más complicada que la del FIX, porque FVIII interacciona con el factor de von Willebrand, que se requiere para su estabilización. Además, se requieren células endoteliales para su síntesis y realizar la terapia génica lejos de los hepatocitos aumenta el riesgo de una respuesta inmunitaria, a lo que se suma que FVIII genera una mayor respuesta inmunogénica que FIX.

El FVIII no entra en los vectores AAV. Se exploraron varias estrategias, como eliminar la fracción B de FVIII (B-domain-deleted, BDD), esto funcionó permitiendo la expresión de FVIII en ratones. Sin embargo, la respuesta inmunitaria al transgén representa una barrera que los científicos todavía no han conseguido superar.

Con otros vectores virales, como retrovirus o lentivirus también se han realizado ensayos, consiguiendo expresión de FVIII, la célula diana en estos vectores son las células madre hematopoyéticas. Además, LV puede utilizarse para producir la expresión de FVIII en plaquetas. Aunque estos vectores son prometedores existen varios problemas como el riesgo de oncogenicidad, inestabilidad genómica, memoria epigenética y la ética de la utilización de estas dianas.

La terapia génica no viral *in vivo* permite la expresión de FVIII mediante una inyección hidrodinámica, pero a diferencia del FIX se desarrollan inhibidores anti-FVIII, terapias inmunomoduladoras previenen la formación de estos inhibidores e inducen tolerancia. Lo mismo ocurre con el transposón Sleeping beauty.

También se ha estudiado la utilización de nanocápsulas que transportan el plásmido y la administración oral, así como la utilización de fibroblastos modificados genéticamente que disminuyen el sangrado y no generan una respuesta inhibitoria, sin embargo, esta mejora solo dura unos 10 meses. Una de las opciones que se están estudiando en la actualidad, es la optimización del FVIII mediante la introducción de secuencias del FVIII porcino al humano.^{6,7}

Diabetes.

La Diabetes Mellitus es una enfermedad de etiología múltiple, puede ser de tipo I, en la que el organismo no puede secretar insulina (porque existe una destrucción de las células β pancreáticas por parte del sistema inmune), o de tipo II en la que existe una resistencia a la insulina. Debido a esto se produce hiperglucemia que puede llevar a múltiples complicaciones, desde microvasculares a neurológicas. El tratamiento en uso es una combinación de fármacos, metformina junto con otro fármaco de los diferentes grupos (sulfonilurea, inhibidor de alfa-glucosidasa, tiazolidindionas...), si con esto no se consigue el control de la glucemia, se recurre a la insulina intravenosa.

La terapia génica en diabetes consiste en la producción de insulina por otro órgano diferente al páncreas que ha sido manipulado genéticamente para ello y con un sistema de control de los niveles de glucosa que impida que se produzca hipoglucemia.

La célula diana ideal será aquella que sea similar a la célula beta pancreática. Las células K del tracto intestinal parecen ser una buena opción debido a que secretan péptido inhibitor gástrico (GIP), que facilita la liberación de insulina y, además, su liberación es dependiente de glucosa, de ahí que también se denomina péptido insulino-trópico-dependiente de glucosa.

El hígado también podría ser una buena diana debido a que los hepatocitos tienen glucoquinasa y el transportador de glucosa tipo 2, que le permite controlar los niveles de glucosa en sangre, pero el

problema es la falta de gránulos que almacenen y liberen la insulina. Además, una de las ventajas del hígado es la facilidad de dirigir los vectores hacia él.

Se consiguió un vector adeno-asociado que transporta pro-insulina y está regulado por el promotor L-PK (isoforma hepática de la piruvato quinasa para el control de la glucemia), se consiguió la liberación de insulina en el hígado frente a una concentración de glucosa, con remisión de la hiperglucemia varios meses en ratones, aun así, todavía existe una posibilidad de sufrir hipoglucemia.

En la diabetes tipo II existe resistencia a la insulina, el tratamiento permite una captación mayor de glucosa por los tejidos periféricos, pero esto genera múltiples efectos secundarios.

Utilizando un vector plasmídico con shARN (small hairpin ARN) que inactive a PEPCCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) se consigue una mejora de la glucemia. Con vectores adenovirales se consigue una mayor eficacia y el efecto es más duradero.

En el músculo, la aplicación de corriente eléctrica junto con la inyección del ADN supone un aumento en la eficiencia de la transfección.

La inyección de vectores adenoasociados es menos inmunogénica que con adenovirus.²

Hipercolesterolemia familiar.

La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad fundamentalmente relacionada con alteraciones en LDLR (receptor de LDL). En este sentido, puede ser homocigótica, producida por una mutación en un alelo del gen que codifica el receptor, o heterocigótica por mutación en ambos alelos de ese gen (más rara). En ambos casos los niveles de colesterol aumentan produciéndose depósitos de lípidos en piel, tendones y arterias, que puede llegar a producir enfermedades cardiovasculares. La terapia farmacológica, como estatinas, disminuyen el colesterol en la hipercolesterolemia heterocigótica, y no funciona en la homocigótica. En estos casos el tratamiento actual consiste en plasmaféresis o LDL-aféresis (tratamiento no universal), se puede realizar un trasplante de hígado, pero requiere inmunosupresión de por vida. La terapia génica ofrece la corrección a largo plazo de los niveles de colesterol del organismo. La expresión de LDLR está regulada por un factor de transcripción llamado SREBP-2. Unos bajos niveles de colesterol en las células, activan al SREBP-2 que aumenta la expresión del LDLR que capta el colesterol-LDL circulante, disminuyendo, por tanto, el colesterol del plasma.

Además de la relación del LDLR con la hipercolesterolemia familiar, en algunos casos se conoce la posible implicación de otros genes y sus productos de expresión génica. Así, la proteasa, PCSK-9, degrada el receptor LDL y su expresión también está regulada por SREBP-2. Si está activa

disminuye el colesterol celular y aumenta el plasmático. Un nuevo tipo de fármacos llevan a cabo el bloqueo de PCSK-9.

También se descubrió otro factor transcripcional, LXR (Liver-X-receptor) que induce la expresión de la proteína IDOL (inducible degrader of the LDLR), que produce ubiquitinización del LDLR y su posterior degradación, lo cual inhibe la captura de LDL y aumenta sus niveles plasmáticos, al igual que en el caso anterior.

En terapia génica se ha intentado modificar el ADN requerido para la degradación de la proteína PCSK-9 e IDOL con la intención de dar a LDLR resistencia frente a los mecanismos de degradación, disminuyendo el colesterol en plasma debido al aumento de los receptores en la superficie celular.

Utilizando un vector adenoasociado (AAV8.LDLR-L318D/K809R/C818A) con sustitución en 3 aminoácidos, se coinyecta con hPCSK9 o hIDOL. Estas tres sustituciones en LDLR, confieren resistencia a las proteínas que lo degradan bajando los niveles de LDL en ratones. Aunque esta disminución no es clínicamente significativa.

Esto muestra que es posible evitar la degradación del receptor, pero solo cuando PCSK9, IDOL o ambos están sobreexpresados en vectores AAV8.

Se están investigando nuevos mecanismos para inhibir a las proteínas implicadas en la degradación de LDLR que den resultados beneficiosos en enfermos con hipercolesterolemia familiar.⁸

Alzheimer.

El desarrollo de la terapia génica para enfermedades neurodegenerativas tiene dificultad añadida debido a que hay que introducir el gen en el sistema nervioso en una parte concreta del cerebro. El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con pérdida de memoria y trastornos conductuales. Los enfermos de Alzheimer suelen tener una vida media de 10 a 12 años desde el comienzo de la enfermedad, ya que la terapia actual es insuficiente y solamente paliativa. Se utilizan inhibidores de la colinesterasa y antagonistas no competitivos del receptor NMDA, receptor ionotrópico de glutamato. Se ha visto que existe un acumulo de proteína beta amiloide y de la proteína tau, aunque todavía no se sabe bien por qué se inicia este proceso. Lo que conlleva a pérdida de la función neuronal, por lo que la terapia génica se centra en activar de nuevo el crecimiento neuronal.

Los vectores AAV son ideales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por su habilidad para llegar en diferentes regiones del cerebro. El serotipo AAV 2/5 es específico de

neuronas. Para introducir el vector en el cerebro se ha visto que no es necesaria cirugía pues es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

El Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) protege a las neuronas y mejora su función por lo que es una buena opción de tratamiento.

El CERE-110 es un vector viral AAV2/2 que contiene el transgén de NGF, controlado por un promotor y la señal de poliadenilación. En el ensayo clínico se vio que la terapia era bien tolerada, segura y no producía toxicidad.^{2,9}

Fibrosis quística.

La fibrosis quística es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por una mutación en el gen que codifica para la proteína CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) cuya función es fundamentalmente facilitar el transporte activo de iones cloro hacia el exterior de la membrana celular. El gen se expresa en múltiples órganos. La fibrosis más desarrollada es la pulmonar, se caracteriza por obstrucción del tracto respiratorio que conlleva múltiples infecciones. El tratamiento actual consiste en antibióticos inhalados, macrólidos y mucolíticos, que aumentan la esperanza de vida.

Se han descubierto correctores del gen CFTR como el potenciador Kalydeco. Con ligeras cantidades de expresión de CFTR se consigue una mejora de la enfermedad, aunque no está claro si es mejor una baja expresión en muchas células o una baja proporción de células que presenten una expresión elevada y en qué células sería más eficaz. No se han observado correcciones de los niveles de Na, pero sí de los demás electrolitos.

El pulmón es un órgano diana difícil de alcanzar por las barreras que lo protegen. Los adenovirus tienen un tropismo natural hacia el pulmón, por ello fueron los primeros estudiados. Se eliminó la región E1 para prevenir la replicación del virus.

Se administró ADNc del CFTR humano dirigido al epitelio pulmonar, mostró una corrección del transporte de cloro pero se vio que no eran adecuados para terapia génica porque la transferencia era ineficiente, la expresión duraba 6 semanas, teniendo que volverse a administrar en ese periodo de tiempo, pudiendo producirse reacciones inmunitarias ya que aparecen anticuerpos neutralizantes del vector.

Se estudiaron los virus adenoasociados que también tienen tropismo por el pulmón. Se utilizó el serotipo 2 pero con resultados decepcionantes, la transducción era ineficaz, el promotor utilizado para generar la expresión del transgén es muy débil in vivo y una administración repetida del vector

no es posible porque se genera respuesta inmunitaria. Se estudiaron otras isoformas para aumentar la expresión del transgén sin resultados.

Otro vector estudiado es Bocavirus humano quimérico (HBoV1) que es capaz de transportar el transgen y muestra eficacia *in vitro*, todavía está por ver su aplicación *in vivo*.

Los vectores lentivirales son prometedores para el tratamiento de la fibrosis quística porque permiten una larga expresión y alta eficacia en repetidas administraciones.

Vectores como el VIH necesitarían combinación de la cubierta con proteínas foráneas (“pseudotyping”) con tropismo por el pulmón, pues este virus no presenta tropismo natural por el pulmón.

En terapia génica no viral, la utilización de un complejo liposómico catiónico con el plásmido que contiene el transgén llega al epitelio nasal eficazmente. Esto se aplicó en ensayos clínicos comprobando que se producía una reacción inflamatoria en el pulmón.

En resumen, los estudios mostraron que la transferencia génica al pulmón era posible consiguiendo una mejora transitoria de los defectos celulares, produciéndose una corrección parcial del transporte de cloro, pero no de sodio, es necesario mejorar la eficacia y duración de la expresión y eliminar la respuesta inmunitaria frente a adenovirus.¹⁰

Distrofia muscular de Duchenne.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular causada por una deficiencia en la proteína distrofina que se encarga de proteger las células musculares. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma X. Las mujeres suelen ser asintomáticas mientras que son los varones los que sufren la enfermedad. Los síntomas de la enfermedad son pérdida progresiva del musculo esquelético, aumento del tejido graso y conectivo, fibrosis cardiaca y cardiomiopatías. El tratamiento actual consiste en la transferencia de mioblastos o inyección directa de ADN.

La terapia génica en la DMD se encarga de reemplazar nuevas formas de distrofina en el musculo esquelético. Para ello se utilizan como vectores virus adenoasociados que son capaces de llegar al musculo. Se han estudiado en ensayos clínicos con humanos sin consecuencias adversas, siendo eficaces y duraderos, el problema es que se necesita disminuir el tamaño de la distrofina para que sea capaz de entrar en el vector y serían necesarios métodos para atenuar la respuesta inmunitaria. Para que este tratamiento sea eficaz se requieren altas dosis del vector (la dosis precisa debe ser determinada), esta cantidad varía en función del serotipo utilizado. El vector está siendo probado en tratamientos inmunosupresores.¹¹

Infección por el VIH.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Humana está causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por una constante destrucción del sistema inmunológico. Hoy en día se conoce como parar el curso de la enfermedad utilizando tratamientos antirretrovirales, aunque todavía no existe cura. Suele utilizarse una combinación de ambos con la consecuencia de que generan mucha toxicidad. La principal manifestación es la aparición de infecciones en función de la disminución del número de linfocitos CD4+.

Hay que destacar que el VIH está desarrollando resistencias al tratamiento actual, esto es lo que hace importante el desarrollo de nuevas terapias, como la terapia génica.

Varios trabajos demuestran que la transfección de iARNs (ARNs de interferencia) dirigidos a varios genes del virus produce la degradación del ARN viral y, por tanto, reducen la cantidad de antígenos en la célula infectada. La coinfección con plásmidos que contienen un promotor de ARN polimerasa II capaz de expresar RNAs, disminuye significativamente la concentración del virus.

Uno de los principales problemas es que cuando se produce una mutación al replicarse el RNA es fácil que el VIH escape del sistema de silenciamiento de genes.

Otra opción es actuar sobre el receptor que identifica los linfocitos CD4, bloqueando su expresión con iARNs. Se demostró que la utilización de iRNAs frente a los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR5 impiden la expresión de los receptores en la superficie celular, lo que bloquea la replicación del virus.^{2, 6}

Cáncer.

El cáncer aparece tras acumulación de múltiples alteraciones genéticas. La mayoría de los tumores presentan células cancerosas de tipo troncal (CSC), es decir células autorreplicativas que originan la diversidad de tumores. Estas CSC dan lugar a células tumorales con distintos marcadores de superficie.

La mayoría de los tratamientos para el cáncer no diferencian una CSC del resto de células tumorales y es necesario que la terapia elimine todas las células del tumor, tanto las que se están replicando como las que no.

Una de las opciones estudiadas para encontrar una terapia génica efectiva contra el cáncer fue la utilización de vectores retrovirales que contenían genes suicidas. Es decir, transportaban un gen que genera una sustancia que provoca la muerte de la célula. Los retrovirus son una buena opción como vector pues infectan las células en división, como las cancerígenas, así no hay peligro de matar otro tipo de células, el problema es que en ese momento no todas las células tumorales se encontraran en

división, por lo que habrá células que no serán eliminadas, pudiendo generar otro tumor. Este sistema ha sido probado con éxito en ratas con tumores cerebrales y en pacientes de glioblastoma. Ninguno se curó, pero el tumor se redujo hasta un 30%.

Un ejemplo, es el gen de la timidina quinasa del Herpes simplex, que al expresarse en la célula tumoral adquiere sensibilidad al antibiótico antiherpético ganciclovir. Primero se introduce el vector en el organismo y después el ganciclovir produciendo la muerte de las células tumorales.

Otra de las estrategias consiste en estimular el sistema inmunitario del paciente contra el tumor, de forma que sea capaz de rechazarlo. Al introducir este tipo de gen se genera una respuesta inflamatoria que genera el rechazo del tumor, se pueden utilizar péptidos, virus recombinantes, células tumorales o dendríticas y proteínas de choque térmico. Con este tratamiento solo se consiguió un 3% de regresión del tumor, lo cual fue decepcionante.

El iARN, también se ha utilizado en este caso contra mensajeros de genes (que intervienen en el desarrollo de tumores), pueden ser proteínas que se sobreexpresan o que sean esenciales para la célula tumoral. La efectividad alcanzada es mucho mayor que con las otras terapias, pero todavía hay que ajustar la dosis o el vector a utilizar.

Ninguna de estas terapias se puede utilizar de forma eficaz contra el cáncer actualmente.¹²

ÉTICA

La terapia génica es un procedimiento innovador que plantea conflictos potenciales de orden médico, ético, económico y social. El progreso que ha tenido en los últimos años ha suscitado un amplio debate sobre su uso.

A la hora de examinar las implicaciones morales de las intervenciones genéticas se suele hacer una doble diferenciación, entre Terapia Génica sobre la línea somática (TGLS) y Terapia Génica sobre la línea germinal (TGLG), y por otro lado en función del objetivo perseguido, donde se habla de fines terapéuticos y fines perfectivos. Mientras la TGLS y los fines terapéuticos suele resultar éticamente aceptable, no ocurre así con la TGLG y la terapia que busca genes perfectivos.

La TGLS actúa sobre el ADN de las células somáticas de un individuo, lo cual significa que cualquier cambio que tenga lugar sólo afectará al individuo y no se transmitirá a sus descendientes. La TGLG, por el contrario, al realizarse sobre las células germinales pasará a la descendencia en todo su organismo, con lo que surge la controversia ética, no sólo por la falta de conocimientos sino

también por razones morales, ya que no es posible contar con el consentimiento de las futuras generaciones.

Por otro lado, cuando hablamos de los fines perseguidos por la TG, se considera moralmente aceptable, aquella que persigue fines terapéuticos, como la erradicación y prevención de enfermedades, no siendo así, cuando el objetivo perseguido son fines perfectivos. Se considera moralmente bueno evitar un mal, pero no mejorar la situación de alguien que no padece enfermedad o trastorno genético causante de sufrimiento.^{2, 13, 14}

En el lado opuesto se encuentran muchos investigadores y personas que consideran que estas modificaciones nos proporcionan mayor libertad y deberían ser de elección propia.

Como decía el Dr. Lewis Thomas “la investigación científica es eficaz. Es el único método de conocer los mecanismos que subyacen tras la enfermedad y el único modo de aprender lo que debe hacerse al respecto. [...] La incapacidad, el dolor y la muerte prematura por enfermedad, son problemas científicos adecuados que pueden ser objeto de análisis, de difícil solución, y es posible que se tarden años en encontrar la respuesta a algunos de ellos, pero debe realizarse esta tarea, porque sencillamente, no existe otra opción”.⁶

CONCLUSIÓN.

La Terapia Génica es una realidad clínica para algunas enfermedades (como en la inmunodeficiencia combinada severa) pero para otras muchas es necesario seguir investigando y realizando ensayos clínicos.

Todavía quedan muchos problemas por resolver como la naturaleza de la mutación, el tamaño del gen, las reacciones adversas, la falta de efectividad, la inmunogenicidad... Pero el potencial terapéutico de la Terapia Génica y sus beneficios son muy altos pudiendo considerarse como una de las medicinas del futuro, tanto para enfermedades hereditarias, como infecciosas, cancerígenas, hepáticas... una vez solventados los problemas por resolver.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Carvagnari, B, Gene therapy: nucleic acids as drugs. Action mechanisms and delivery into the cell. Arch. Argent pediatr. 2011. 109:237-244
2. Liras Martín F.A., Terapia génica ¿memoria o esperanza?, 2008. Editorial Complutense S.A. Madrid. 2008

3. O'Reilly, M y cols, Gene Therapy: charting a future course. *Hume Gene Ther.* 2014. 25(6): 488-497
4. Han, S y cols, Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther.* 2000. 2(4): 302-317
5. Kotterman, M.a. y cols, Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and clinical outlook. *Rev. Biomed. Eng.* 2015. 17:63-89
6. *Terapia Génica / Fundación BBV*; traductor José Gerardo Abella. Madrid: Fundación BBV, D.L. 1997.
7. L.Rogers G, W. Herzog R, Gene Therapy for hemophilia, 2015. University of Florida, Department of Pediatrics, Division of Cellular and Molecular Therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20: 556-603.
8. Murray W. Huff, Julia M. Assini, Robert A. Hegele, Gene Therapy for Hypercolesterolemia, 2017. *American Heart Association* 115:542-545.
9. Combs B, Kneynsberg A, M.Kanaan N, Gene Therapy Models of Alzheimer's Disease and Other Dementias, 2016. *Methods Mol Biol.* 1382:339-366.
10. M. Pytel K, W.F.W Alton E, Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere, 2015. *Human Gene Therapy*, 26:266-275.
11. Ramos J, Chamberlain J, Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy, 2015. *Expert Opin Orphan Drugs.* 3(11): 1255-1266.
12. Izquierdo Rojo M, *Curso de genética molecular e ingeniería genética*, 2014. Editorial: Pirámide.
13. Agudelo Vélez, C.A. y Martínez Sánchez, L.M. *Terapia génica: una opción de tratamiento y una controversia ética.* *Salud uninorte.* 2013. 29: 341-350
14. Da Cruz Freire, J.E. y cols, Bioethical conflicts of gene therapy: a brief critical review. *Rev Assoc Med Bras.* 2014. 60:520-524