



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**Nuevas Aproximaciones Terapéuticas para la Enfermedad
de Pompe.**

Autor: Raúl Justo Sanz

D.N.I.: 51133160-C

Tutor: Carlos Guillén Viejo

Convocatoria: 30 de Junio 2015

1) RESUMEN

La enfermedad de Pompe es una enfermedad autosómica recesiva de depósito lisosomal en la que la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA) está deficiente o ausente. La deficiencia lisosomal de esta enzima supone un acúmulo de glucógeno en múltiples tejidos, siendo el músculo cardíaco y el esquelético los más afectados. El espectro clínico varía en función del momento de la vida en la que aparece la enfermedad, distinguiéndose de este modo la variedad infantil y la variedad juvenil o adulta, siendo una enfermedad mortal si no se trata ni diagnostica a tiempo.

En la actualidad, la terapia de sustitución enzimática (TSE) ha resultado ser la única terapia aprobada en humanos, con éxito en los síntomas cardíacos, pero no suficiente para tratar de forma efectiva los síntomas del músculo esquelético. Por este motivo es necesario que aparezcan nuevas terapias, que administradas en humanos en combinación con la TSE, pudieran ser capaces de revertir la sintomatología de la enfermedad. De este modo, han surgido en los últimos años estudios centrados en nuevas aproximaciones terapéuticas, que al menos en modelos animales, parecen ser prometedores para aumentar la esperanza y calidad de vida del afectado con enfermedad de Pompe. Este trabajo trata de recoger las principales estrategias terapéuticas de relevancia clínica en el estudio del tratamiento de esta enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad de Pompe, Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, Terapia de sustitución enzimática (TSE), Autofagia, Lisosoma, Enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA), Enfermedades de depósito lisosomal (EDL).

2) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD DE POMPE:

La enfermedad de Pompe es una miopatía metabólica severa causada por la deficiencia de la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA o maltasa ácida), responsable de degradar el glucógeno en glucosa en el ambiente ácido de los lisosomas. La deficiencia funcional o ausencia completa de la enzima conlleva una acumulación de glucógeno dentro de este compartimento celular. Este hecho implica un trastorno sistémico que se puede localizar en múltiples tejidos, siendo el músculo esquelético y cardíaco los más vulnerables a dicha acumulación de glucógeno y cuerpos autofágicos secundarios.

La enfermedad de Pompe se hereda de forma autosómica recesiva, lo que significa que los dos padres de un niño afectado deben ser portadores de la variante mutante del gen.



Figura 1-(Fundación Genzyme)

La enfermedad de Pompe (EP) es considerada una enfermedad rara, ya que la incidencia mundial estimada es de un caso de cada 40.000 habitantes. Se han documentado diferencias en la incidencia de dicha enfermedad en función del lugar de origen del afectado, de ahí la conveniencia de crear un registro nacional de dicha enfermedad.

Aunque la enfermedad de Pompe es un trastorno poco frecuente, presenta características patológicas comunes con otras muchas enfermedades de depósito lisosomal (EDL), que abarcan más de 60 enfermedades distintas. Estas EDL resultan de la incapacidad de degradar distintas macromoléculas por un defecto enzimático lisosomal específico, produciendo la respectiva acumulación lisosómica de la macromolécula que no puede degradarse.

Los lisosomas, orgánulos celulares formados por el retículo endoplásmico rugoso y posteriormente empaquetados por el aparato de Golgi, contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas usadas para reciclar los diferentes orgánulos y macromoléculas de la célula y liberar los residuos generados hacia el citosol. De este modo, las EDL ocurren por deficiencia de una hidrolasa, de una proteína activadora de la enzima o de un transportador de la membrana lisosomal, encargadas o bien de hidrolizar las moléculas complejas a otras más simples, o bien de facilitar la salida de estas pequeñas moléculas hacia el exterior del orgánulo, evitando su acumulación lisosomal.

En el caso de la enfermedad de Pompe, la acumulación de glucógeno se debe a la deficiencia de la enzima GAA, la cual en condiciones normales se sintetiza de forma inactiva en el retículo endoplásmico, se transporta hacia el aparato de Golgi, y posteriormente se dirige hacia los lisosomas. Es en los lisosomas donde tiene lugar una modificación postraduccional de la enzima hasta convertirse en la isoforma activa de la misma, de 76 y 70 kDa.

El acúmulo progresivo de glucógeno intralisosomal es la lesión primaria, la cual causa interferencia con el proceso normal de autofagia (proceso de degradación de los diferentes componentes del

citoplasma celular que favorece un adecuado balance entre la biogénesis y la degradación de dichos componentes celulares). Son tres las formas de autofagia a nivel celular:

- 1) La autofagia mediada por chaperonas (responsable de la degradación únicamente de proteínas solubles).
- 2) La microautofagia, donde se engloba directamente el contenido que se va a degradar.
- 3) La macroautofagia (vía autofágica mayoritaria implicada en la enfermedad de Pompe), donde se forman unas vesículas de doble membrana que secuestran los elementos del citosol que van a ser degradados. Tras su fusión se crea una vacuola autofágica o autofagosoma que posteriormente se unirá a los lisosomas, implicados en la degradación de los componentes celulares.

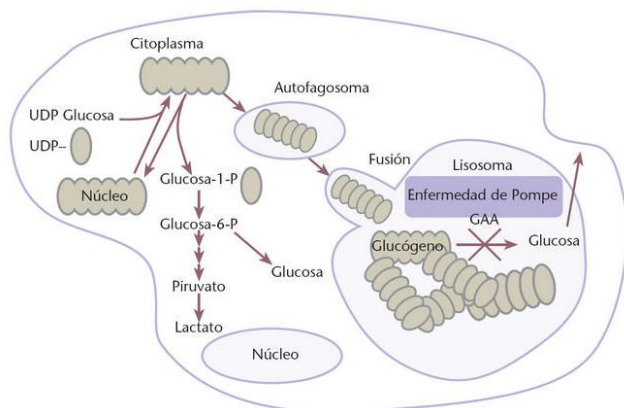


Figura 2- Modelo de aclaramiento lisosomal

VARIANTES CLÍNICAS y SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD DE POMPE.

1) VARIEDAD INFANTIL

En la variedad infantil de la enfermedad, al contrario que en la variedad juvenil y adulta, no suele haber actividad alguna de la enzima implicada en la patología, lo que ocasiona que los pacientes con esta forma de la enfermedad presenten la sintomatología más severa: debilidad profunda, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, dificultades de alimentación, infecciones respiratorias que degeneran en neumonía y, si no se trata, puede causar la muerte por fallo cardiorespiratorio.

Aunque generalmente, los afectados parecen sanos al nacer, los primeros síntomas graves suelen detectarse a partir del segundo mes de vida. La enfermedad progresa entonces muy rápidamente al depositarse el glucógeno, principalmente, en el músculo esquelético y en el corazón. En ausencia de

tratamiento mediante sustitución enzimática es muy raro que estos niños superen el año de vida, estando la esperanza media de vida en torno a los ocho meses.

2) VARIEDADES JUVENIL Y ADULTA

En las formas tardías de la enfermedad (fenotipos atenuados, o forma de inicio tardío) los pacientes tienen una actividad enzimática residual que, normalmente, es suficiente para que no se produzca una afectación cardíaca relevante. Sin embargo, el glucógeno sí se acumula en el músculo esquelético y sigue siendo una enfermedad grave que produce insuficiencia motora progresiva, insuficiencia respiratoria e incluso la muerte prematura.

Los síntomas de las variedades tardías de la enfermedad son los propios de una miopatía y pueden aparecer desde los dos primeros años de vida como hasta la séptima década de vida. Cuanto más precoz sea la aparición de los síntomas, mayor es el grado de afectación del paciente. Aunque el depósito de glucógeno no se almacena tan rápidamente como en la variedad infantil, la enfermedad es progresiva, con efectos devastadores sobre la calidad y la esperanza de vida de los afectados.

En la variedad juvenil los primeros síntomas aparecen en la primera década de vida, incluso después de cumplir los tres años. Un primer signo de la enfermedad en estos niños es la dificultad para alcanzar a tiempo las habilidades motoras propias de la edad. En las etapas iniciales de la enfermedad surgen problemas a la hora de realizar actividades físicas, tales como subir escaleras, y más adelante los afectados terminan caminando con dificultad.

A medida que progresa la enfermedad se ven principalmente afectados el tronco y los miembros inferiores. Aparte de la afectación muscular, también está demostrada la acumulación de glucógeno en los nervios periféricos. La escoliosis, la aparición de contracturas en las articulaciones y el acortamiento de los ligamentos son complicaciones frecuentemente asociadas al progreso de la patología.

Más adelante, surgen problemas para ingerir alimentos y una severa insuficiencia respiratoria al verse afectado el músculo diafragmático pudiendo desembocar en la aparición de neumonías recurrentes.

DIAGNÓSTICO

-La actividad enzimática de la enzima GAA medida en fibroblastos, se considera el estándar de oro para su diagnóstico. Debido a que los fibroblastos de la piel tienen la mayor actividad de la enzima GAA y muy poca actividad de alfa-glucosidasa neutra, la interferencia entre ambas es mínima, no

obstante, el resultado de dicha prueba puede tardar entre cuatro y seis semanas. La prueba permite distinguir entre las formas clásica y tardía de la enfermedad, por lo que resulta ser el método más empleado para el diagnóstico de la enfermedad.

-La actividad enzimática medida en linfocitos es un método que en pocos días aporta un resultado parcialmente confirmatorio; la prueba muestra una sensibilidad y una especificidad diagnósticas adecuadas siempre que se cumplan los requisitos para la obtención de la muestra.

-La cuantificación de la actividad de la GAA en gotas de sangre seca en papel filtro es un método relativamente nuevo. Es una técnica poco invasiva y no se requiere un manejo muy sofisticado de la muestra.

-Se considera que la biopsia muscular no es siempre necesaria en la forma clásica si el diagnóstico clínico y bioquímico es concluyente, sin embargo, en la enfermedad de Pompe tardía puede ser útil. Su principal utilidad es en el diagnóstico diferencial con las enfermedades neuromusculares degenerativas.

En la forma clásica, hasta el 75 % de las fibras está afectado, mientras que en la forma tardía entre el 10 y 50 %. Aun cuando la biopsia muscular es normal, puede recurrirse al estudio de la actividad enzimática en el músculo, siendo este método invasivo y no frecuentemente utilizado.

3) OBJETIVOS

El propósito del trabajo es reunir en un documento el conjunto de las estrategias terapéuticas que actualmente se están aplicando a nivel clínico para la enfermedad de Pompe (Terapias paliativas y Terapia de sustitución enzimática) así como las nuevas terapias, que aplicadas en modelos animales con enfermedad de Pompe, parece que puedan ser útiles en el aclaramiento del glucógeno lisosomal de músculo cardíaco y esquelético. Si se comprobara la eficacia, seguridad y calidad de estas nuevas aproximaciones terapéuticas en humanos, combinándolas con las terapias ya aplicadas, se podría revertir la sintomatología de la enfermedad y aumentar notablemente la calidad y esperanza de vida de los enfermos con la enfermedad de Pompe.

4) METODOLOGÍA

La metodología utilizada para el desarrollo de este trabajo consistió en partir del conocimiento de la situación actual de la enfermedad de Pompe. Por ello se hizo una revisión de ésta, que permitió contextualizar su situación actual y poder, finalmente, proponer unas directrices que han servido de guía a la hora de orientar el desarrollo del trabajo.

Dicho trabajo consistió en la revisión bibliográfica sobre el tema, lo que permitió hacerse una idea del panorama general sobre el estado en el que se encuentra la temática de investigación. Las búsquedas bibliográficas y el material de apoyo seleccionado se recogen en el apartado de Bibliografía.

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado anteriormente el trabajo se centra en hacer una recopilación del conjunto de las terapias que se están aplicando actualmente en la clínica de la enfermedad de Pompe (a y b) y las nuevas terapias (c, d, e, f y g) , que todavía aplicadas en modelos animales, pudieran suponer un avance terapéutico importante en la sintomatología de la enfermedad.

a)-TERAPIAS PALIATIVAS:

Hasta fechas relativamente recientes, la mayor parte de los enfermos de Pompe tan sólo recibían terapias paliativas que aliviaban los síntomas pero que no ayudaban a resolver el curso, frecuentemente mortal, de la enfermedad. Entre las terapias paliativas más comunes están: empleo de fármacos diuréticos y β -bloqueantes; dietas hipoproteicas y pobres en hidratos de carbono; administración de L-alanina (que según ciertos estudios se supone que retrasa el deterioro del músculo esquelético); realización de ejercicios aeróbicos y otras como la respiración asistida o la gastrostomía (sonda de alimentación a nivel estomacal) debido a la dificultad respiratoria e incapacidad de ejercer la deglución correctamente.

b)-TERAPIA DE SUSTITUCIÓN ENZIMÁTICA (TSE):

La TSE, es la única terapia que actualmente ofrece unas perspectivas sólidas para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Esta terapia consiste en la administración intravenosa de una forma precursora de la enzima alfa 1,4-glucosidasa, capaz de penetrar en los lisosomas. Dicha variedad de la enzima se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética, y se conoce como alfa 1,4 glucosidasa humana recombinante. En la actualidad, está disponible bajo el nombre comercial de Myozyme.

Desde el año 2000, la producción del medicamento y los derechos de comercialización de las diferentes versiones de la enzima se encuentran exclusivamente en manos de la compañía farmacéutica norteamericana Genzyme, que ha optado por producir la enzima tan sólo a partir de células CHO, al igual que para otras enfermedades de origen lisosomal.

Han existido, además, otras versiones de la enzima alfa 1,4 glucosidasa humana recombinante, producidas también a partir de células CHO, que surgieron como consecuencia de otros intentos para obtener una TSE para la enfermedad de Pompe. Una de estas versiones fue desarrollada por la compañía farmacéutica Novazyme, y aunque sus derechos de producción fueron adquiridos posteriormente por Genzyme, en la práctica no demostró tener una eficacia superior a la versión de la enzima que actualmente se comercializa como Myozyme, particularmente en lo que se refiere a la penetración de la enzima en el músculo esquelético.

En 2006 la Comisión Europea y las autoridades sanitarias estadounidenses aprobaron el uso comercial de Myozyme, basándose en los ensayos clínicos que, desde 1998, se habían venido desarrollando para pacientes infantiles en Holanda, Estados Unidos, Alemania, Francia, Bélgica, Reino Unido, Israel y Taiwán. Con anterioridad a la aprobación del medicamento -por parte de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y de su equivalente norteamericana FDA -, y teniendo en cuenta el buen funcionamiento de éste, ya se habían establecido **programas de uso compasivo** (Uso compasivo de medicamentos en investigación: utilización de un medicamento que está en ensayo clínico antes de su autorización) bastante amplios en dichos países, así como en otros, entre los que pueden destacarse Canadá, Italia, Argentina y España.

La aprobación del medicamento ha permitido que, hasta la fecha, reciban tratamiento alrededor de 2000 enfermos infantiles, juveniles y adultos en aproximadamente 60 países.

La TSE ya está disponible, por tanto, para varias enfermedades de depósito lisosomal incluyendo la enfermedad de Pompe. Por desgracia, en muchas de estas enfermedades los tejidos diana no son de fácil acceso para las enzimas de reemplazo.

En la enfermedad de Pompe, el objetivo principal de la terapia es el hacer llegar la enzima humana recombinante a los lisosomas del músculo esquelético, no obstante, incluso con dosis muy altas de la enzima, muchos pacientes experimentan un beneficio limitado o muestran signos clínicos limitados de progresión de la enfermedad.

Ventajas de la TSE:

1) Ha tenido lugar un aumento muy notable en las expectativas de vida de los pacientes tratados. Algunos de los pacientes con la variedad infantil de la enfermedad tratados con TSE, han alcanzado la edad de catorce años, ya que sin acceso a dicha terapia la esperanza media de vida no llega a superar el año.

2) Se ha producido una mejora generalizada de la afectación cardiaca en la práctica totalidad de los pacientes infantiles tratados, traducida tanto en una mejora de la función cardiaca como en una disminución del tamaño del corazón hasta alcanzar los niveles normales típicos de una persona sana.

3) Igualmente, se ha producido una mejora generalizada de la afectación hepática en casi la totalidad de los pacientes tratados, para todas las variedades de la enfermedad.

4) En buena parte de los pacientes que han accedido a la TSE de forma precoz, se ha logrado detener de forma notable la acumulación de glucógeno en el diafragma y en el músculo esquelético. Resulta especialmente significativo que existan pacientes infantiles que sean capaces de respirar autónomamente y que hayan alcanzado niveles de actividad motora que pueden considerarse bastante aceptables para su edad.

Inconvenientes de la TSE:

El principal inconveniente de la TSE es la variabilidad de la respuesta en función del paciente, que en muchos de los casos da lugar a una respuesta insuficiente y limitada. Entre los motivos por los que los pacientes no responden bien a la TSE o lo hagan de forma desigual están, entre otros, los siguientes:

1) El momento del inicio de la intervención con la TSE: En la forma infantil de la enfermedad se observa que conforme avanza la enfermedad, el daño al miocardio progresa y en las formas tardías la degeneración muscular lleva a la dependencia de ventilación asistida. De tal manera, una vez que cualquiera de estas dos manifestaciones llega a un punto crítico de disfunción cardiaca, muscular o pulmonar, el cuadro se torna irrecuperable aun con la TSE. Por ello es de especial importancia un diagnóstico temprano de la enfermedad, para iniciar cuanto antes sea posible, la TSE.

2) Tipo de fibra muscular: Se ha demostrado que en función del tipo de fibra muscular al que nos refiramos la abundancia de los receptores manosa 6-fosfato (M6P) varía. La absorción de la enzima

del torrente sanguíneo al interior del lisosoma se logra mediante la adición de manosa-6-fosfato a la molécula de la enzima GAA, que interaccionará con los correspondientes receptores manosa-6-fosfato lisosomales.

En el músculo cardíaco, la enzima es muy eficaz para revertir la cardiomegalia en prácticamente todos los pacientes tratados. Las membranas de las células del miocardio contienen un mayor número de receptores del enlace manosa-6-fosfato comparado con las fibras musculares esqueléticas. En el músculo estriado, las fibras tipo I son más ricas en estos receptores que las tipo II, lo que mejora considerablemente la evolución en las primeras.

Las investigaciones que actualmente se llevan a cabo con vista a la obtención de una segunda generación de la enzima se centran precisamente en la obtención de una enzima mejorada con mayor afinidad para los enlaces M6P, una de cuyas versiones, diseñada por la compañía farmacéutica Genzyme, se encuentra ya en fase de ensayo clínico gracias a la autorización por la FDA en el año 2013.

3) Dosificación: La dosis terapéutica estándar inicial es de 20 mg/kg por infusión, cada dos semanas. En artículos especializados se plantea que la transición hacia dosis personalizadas es una necesidad por cubrir en los casos donde no se muestre una respuesta favorable en los diferentes parámetros que se evalúan durante el tratamiento.

4) Respuesta inmunológica a la enzima:

Cuando se administra una proteína extraña a un humano, lo natural es que ocurra una respuesta del sistema inmune y ésta genere anticuerpos contra esa proteína. La TSE no es la excepción. Los pacientes con mutaciones que impiden totalmente la producción de la enzima GAA muestran CRIM negativo (CRIM-), por lo que al inicio de la TSE se presenta una respuesta inmunológica que bloquea casi totalmente el efecto de la enzima, haciendo que la TSE sea ineficaz en el paciente.

Los pacientes con la forma tardía muestran CRIM positivo (CRIM+), es decir, la producción de proteína mutante endógena a bajos niveles es suficiente para tolerar mejor la forma sintética de la enzima, haciendo que la eficacia de la TSE sea mayor.

Por este motivo, se recomienda controlar periódicamente la formación de anticuerpos IgG en los pacientes tratados con GAA, porque en la mayoría de los estudios clínicos, los pacientes desarrollaron anticuerpos IgG (generalmente en los primeros tres meses de tratamiento), limitando la eficacia de esta terapia sustitutiva.

Cerca de 14 % de los pacientes que reciben TSE muestran signos y síntomas de rechazo inmunológico, principalmente en tres sistemas: el de la piel (urticaria, rash, eritema, y prurito), el cardiovascular (palidez, hipertensión o hipotensión, en función del paciente) y el respiratorio (tos, taquipnea,...). Estos datos, en particular las reacciones que van de moderadas a graves (o las recurrentes), se atribuyen a la formación de anticuerpos IgE específicos para la α -glucosidasa sintética. Por este motivo la administración de la enzima debe tener lugar, al menos durante la primera fase de la infusión, de una forma relativamente lenta para prevenir reacciones alérgicas.

De este modo, son varios los factores que contribuyen a la resistencia del músculo esquelético a la terapia de sustitución enzimática (TSE). Entre estos factores se incluyen la gran masa de tejido muscular, una densidad relativamente baja del receptor de manosa-6-fosfato que es responsable de la absorción de la enzima, el tráfico ineficiente de la enzima internalizada a los lisosomas, y la respuesta inmunológica a la enzima recombinante (CRIM) en los pacientes negativos (CRIM-), entre otros.

Mientras tanto, otras investigaciones sugieren, también, que la combinación de la versión actual de la enzima con ciertos medicamentos como el clenbuterol, enzimas como la hialuronidasa, o bien con ciertos compuestos químicos que actúen como activadores enzimáticos, podría servir para potenciar la actividad de la alfa 1,4-glucosidasa humana recombinante y/o para mejorar su absorción en el músculo esquelético.

En este sentido, las investigaciones actuales parecen indicar que la combinación de la TSE con alguno de estos potenciadores químicos (cuya administración con Myozyme está siendo objeto de un ensayo clínico que comenzó en 2012 bajo supervisión de la FDA), podría sentar las bases terapéuticas para el tratamiento futuro de los afectados por la enfermedad de Pompe.

Por último, cabe mencionar, que es igualmente posible la consecución del transporte enzimático a los lisosomas a través de receptores distintos a la M6P lisosomales; en este sentido, la compañía farmacéutica norteamericana ZyStor, comenzó a desarrollar hace algunos años una versión de la enzima alfa 1,4-glucosidasa humana recombinante en la que el enlace químico con los lisosomas no se lleva a cabo a través del monosacárido M6P, sino a través de un péptido, enfoque que permite un procesamiento mucho más eficiente del glucógeno acumulado en el músculo esquelético.

Debido a que la enzima puede presentar limitaciones para penetrar adecuadamente en el lisosoma y realizar su función en el músculo esquelético, las nuevas versiones que puedan surgir en el futuro de

la enzima alfa 1,4-glucosidasa humana recombinante tendrán que basarse necesariamente en el estudio de los obstáculos con los que puede encontrarse la enzima actual para lograr una penetración más eficiente y generalizada en los lisosomas de los tejidos musculares (diana terapéutica).

Importantes esfuerzos están orientados a mejorar la terapia actual, tales como el desarrollo de enzimas recombinantes de "segunda generación", con propiedades de direccionamiento mejoradas y con acompañantes farmacológicos que ayuden al plegamiento de la enzima mutante o aumentar la estabilidad de la enzima recombinante.

c) ADMINISTRACIÓN DE CHAPERONAS MOLECULARES:

Estudios recientes avanzan que la administración de chaperonas moleculares podría ser útiles para paliar el defecto genético causante de la acumulación de glucógeno en los lisosomas.

Estas chaperonas están formadas por grupos moleculares cuya función consiste en favorecer el plegamiento adecuado de la enzima GAA a nivel postraduccional dentro del proceso de la síntesis proteica.

En principio, las chaperonas moleculares no formarían parte de la estructura primaria de la proteína alfa 1,4-glucosidasa, sino que sólo se unirían a ella para ayudar a su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a los lisosomas, donde se alcanzarían, entonces, niveles de actividad biológica de la enzima, propios de los individuos sanos. Esta posible terapia sería útil para subsanar deficiencias enzimáticas provocadas por mutaciones que conlleven cambios puntuales en la conformación tridimensional de la enzima. Por tanto, en principio, su aplicación tan sólo podría resultar eficiente para pacientes que sufrieran mutaciones puntuales que alteren el plegamiento de la enzima, como podría ser la sustitución de un aminoácido por otro durante el proceso de la síntesis proteica.

La compañía farmacéutica Amicus Therapeutics ha llevado a cabo esfuerzos encaminados a desarrollar un fármaco que permitiera la administración oral de chaperonas moleculares a pacientes con la enfermedad de Pompe, fármaco que se encuentra actualmente en ensayo clínico.

En cualquier caso, investigaciones recientes demuestran que la combinación de la Terapia de Chaperonas Moleculares con la Terapia de Sustitución Enzimática (TSE) puede servir para estabilizar la enzima alfa-1,4 glucosidasa humana recombinante administrada en el torrente sanguíneo y, por tanto, podría potenciar los efectos terapéuticos de la enzima, con independencia de las mutaciones de las que sea portador el paciente.

Existe un ensayo clínico en curso, desde 2011, en la universidad de Florida, y bajo supervisión de la FDA, que trata de demostrar los efectos positivos del uso combinado de la terapia de sustitución enzimática y las chaperonas moleculares.

d)-TERAPIA DE INHIBICIÓN DE SUSTRATO

La terapia de inhibición de sustrato consiste en minimizar la biosíntesis de la sustancia causante de la enfermedad, para evitar que grandes cantidades de dicho sustrato se acumule en los lisosomas, como consecuencia de la deficiencia de la enzima que debería degradarlo. Dicha terapia no proporciona una reversibilidad de los síntomas de las EDL, pero puede retardar o impedir la acumulación del sustrato en los lisosomas en proporciones tóxicas.

Además, la administración de estos fármacos es mucho más sencilla que en caso de la TSE, pues tiene lugar por vía oral, además de ser más económica. No obstante, para la enfermedad de Pompe no se ha desarrollado de forma definitiva ningún fármaco que inhiba la síntesis del glucógeno antes de que éste sea absorbido por los lisosomas. Sin embargo, en teoría, esta opción podría ser también factible para dicha enfermedad y no puede descartarse que se lleve a cabo durante los próximos años.

Es conocido que la familia mTOR "mammalian Target of Rapamycin" es una familia de serín-treonín-quinasas presentes en las células de los animales mamíferos que tiene importantes funciones, entre ellas integrar la información proveniente de nutrientes o factores de crecimiento. Se encuentra en forma de dos complejos proteicos:

-mTORC1 (target of rapamycin complex 1): se encarga de regular rutas implicadas en la traducción del mRNA, en la autofagia y en otras respuestas celulares, en concreto en el crecimiento y diferenciación celular.

-mTORC2 (target of rapamycin complex 2): regula componentes del citoesqueleto y la señalización de la insulina.

Diversos estudios en ratones sugieren que la inhibición de mTORC1 con rapamicina (Rap) puede suponer un beneficio en la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético.

Parece ser que mTORC1 podría regular parcialmente y de forma indirecta la actividad de la GS (glucógeno sintasa), enzima implicada en la síntesis de glucógeno, por afectar a su estado de fosforilación. La actividad de la enzima GS se regula por la fosforilación en varios sitios de la misma, incluyendo el residuo de Ser 641, que es conocido por reprimir la actividad GS cuando éste residuo se fosforila. El tratamiento con el inhibidor de mTORC1, Rapamicina (Rap), provocaría una

fosforilación en el residuo Ser 641/645 de la enzima GS del músculo esquelético, quedando la GS fosforilada e inactiva. Este hecho indica que mTORC1 regula, al menos parcialmente, la actividad de dicha enzima a nivel muscular.

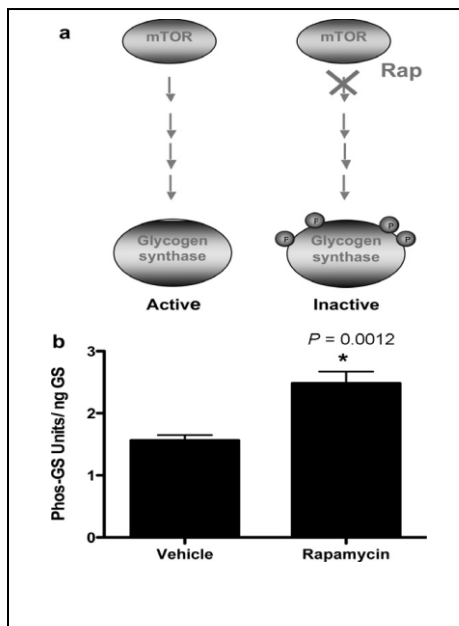


Figura 3- (Bibliografía, referencia 8)

Este resultado sugiere que la rapamicina podría reducir la síntesis de glucógeno a nivel muscular y de ese modo supone una futura terapia que se podría complementar con la actual TSE en la enfermedad de Pompe, ya que se vería reducida la síntesis de glucógeno en el músculo. Para probar esta hipótesis, se evaluaron los efectos de la rapamicina en combinación con dosis crecientes de la enzima recombinante GAA durante 12 semanas, sobre los niveles de glucógeno en ratones. El análisis bioquímico en los tejidos de los ratones demostró que la rapamicina en combinación con la enzima recombinante GAA supuso una disminución de los niveles de glucógeno en corazón, músculo esquelético, y en el diafragma.

Del mismo modo se comprobó que la inhibición de la vía mTORC1 con rapamicina no afectaba a los niveles de glucógeno hepático, lo que confirma que la rapamicina no inhibe la gluconeogénesis hepática y por tanto no afecta a la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo.

También se ha demostrado en modelos animales que la eficacia de la enzima recombinante GAA en dosis múltiple puede verse afectada por la acción de los anticuerpos anti enzima recombinante humanizada GAA. Experimentos actuales, consideran que la administración de rapamicina reduce drásticamente los títulos de anticuerpos contra la enzima. Esto es así debido a que la rapamicina es un agente inmunomodulador clínicamente indicado en la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes tras recibir un trasplante renal. De esta forma el empleo de rapamicina hace aumentar la eficacia de la TSE en aquellos individuos CRIM (-), debido a su acción inmunomoduladora. De este modo se ha demostrado cómo el aumento de la fosforilación de GS en el músculo esquelético a través de la inhibición de mTORC1 con rapamicina representa un potencial nuevo enfoque terapéutico para enfermedades que implican una acumulación de glucógeno en el músculo. En modelo de ratón con la enfermedad de Pompe, se demuestra que la rapamicina combinado con la TSE mejora la depuración de glucógeno en el músculo esquelético y diafragma. En conclusión,

estos resultados preclínicos realizados en modelos animales sugieren un papel potencial de la rapamicina como terapia adyuvante a la TSE.

Otros tratamientos de inmunosupresión están actualmente en uso en pacientes con enfermedad de Pompe, pero no hay evidencia de que tengan la ventaja añadida que ofrece la rapamicina al inhibir la biosíntesis de glucógeno.

e)-TERAPIAS GÉNICAS

Buena parte de la investigación reciente sobre la enfermedad de Pompe se ha centrado en el desarrollo de terapias génicas que pudieran proporcionar una corrección duradera del defecto genético que causa la deficiencia enzimática. La mayor parte de los estudios se han basado en la utilización de virus adenoasociados capaces de penetrar en las células y permitir la introducción del gen que da la orden para la síntesis de la enzima deficiente GAA.

Siguiendo este enfoque, se han logrado, desde hace ya algunos años, buenos resultados en ensayos preclínicos con modelos animales en los que, mediante infusión intravenosa, se logra una notable absorción del gen en el hígado con el objeto de hacerle sintetizar la enzima para que ésta sea distribuida por el resto del organismo, e incluso de prevenir una respuesta inmunitaria a la misma; o bien en los que se ha logrado infectar directamente a ciertos músculos del organismo que, una vez alcanzados por el vector vírico, son capaces de generar la enzima.

Este último enfoque presenta las ventajas de reducir la respuesta inmunológica a la enzima recombinante y de superar los problemas para la penetración de la misma en el músculo esquelético. En la mayor parte de estos ensayos se ha logrado una corrección duradera del defecto genético y un aumento notable de la actividad de la enzima GAA con el consiguiente descenso del depósito de glucógeno en el músculo.

De todas maneras, aunque los resultados son esperanzadores, la mayor parte de los intentos de desarrollo de una terapia génica para la enfermedad de Pompe se han llevado a cabo, únicamente, con modelos animales. Hasta tiempos recientes, la única iniciativa probada directamente en seres humanos había tenido lugar, sin éxito, en 1996, bajo la dirección del Dr. Martiniuk del New York University Medical Center.

Aun así, en 2010 se produjo un importante avance para este tipo de terapias, al autorizar la FDA al equipo del Dr. Barry Byrne, en la Universidad de Florida, la puesta en marcha de un ensayo clínico cuyo objetivo es reducir o eliminar, mediante técnicas de terapia génica, la dependencia de la respiración asistida de pacientes infantiles gravemente afectados por la enfermedad de Pompe. Este ensayo clínico, que se encuentra en su fase II, se ha venido desarrollando a lo largo del periodo 2011-2014, centrándose, exclusivamente, en niños con un alto grado de dependencia respiratoria. El

ensayo se ha diseñado teniendo en cuenta el potencial y los buenos resultados de investigaciones preclínicas basadas en la introducción del gen GAA directamente en los músculos del diafragma mediante un vector vírico y ya se han publicado los primeros resultados positivos para los pacientes que han participado en el estudio.

Debe resaltarse, sin embargo, que las terapias génicas todavía presentan problemas, como la reacción del sistema inmunológico frente a la infección con vectores víricos, la toxicidad de dichos vectores, el control de los efectos secundarios que podrían tener este tipo de terapias, o la consecución de una persistencia duradera de los genes introducidos en el organismo. Aun así, los avances en este campo hacen que en un futuro tratamiento de la enfermedad de Pompe tenga lugar a través de este tipo de terapias, en combinación con la TSE.

f)- TERAPIA BASADA EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS

En estadios avanzados de la enfermedad de Pompe, la TSE y las terapias génicas pueden tener sus limitaciones. La reversibilidad de la afectación en el músculo esquelético mediante el uso de la TSE puede verse limitada por el hecho de que el glucógeno acumulado llegue a alterar la estructura bioquímica de los lisosomas y el proceso autofágico intracelular, y, en consecuencia, impida que la terapia sustitutiva ejerza su función metabólica de forma eficiente.

De igual modo, en el caso de pacientes muy afectados por la enfermedad, una excesiva acumulación de glucógeno puede producir una ruptura de los lisosomas y la consiguiente muerte celular. Por tanto, parte de los daños causados por la enfermedad podrían ser irreversibles a pesar de la aplicación de la TSE o de potenciales terapias génicas. Este problema afectaría, principalmente, a los pacientes que accedan a este tipo de tratamientos de una forma tardía.

Aunque todavía no hay demasiados resultados al respecto, la mayor esperanza para dichos pacientes podría estar en la combinación de la terapia génica con terapias de regeneración muscular mediante el uso de células madre adultas extraídas a partir de la médula ósea o de otros tejidos. De hecho, las terapias de regeneración muscular para la reparación de los daños producidos por las miopatías se están investigando desde hace varios años. Aunque la mayor parte de estos estudios todavía se llevan a cabo *in vitro* y con aplicaciones en modelos animales, en los últimos años, se han producido avances muy significativos del conocimiento en dicho campo.

Recientemente también se han desarrollado esfuerzos investigadores en el campo de las células madre, centrados específicamente en la enfermedad de Pompe, incluyendo modelos experimentales murinos que han proporcionado buenos resultados mediante la combinación de técnicas de terapia génica y de implantación de células madre hematopoyéticas, lo cual podría sentar las bases para una verdadera corrección de los efectos de la enfermedad.

De particular interés resulta la reciente obtención, a partir de la piel de enfermos de Pompe, de células madre pluripotentes capaces de diferenciarse en células musculares.

Los mencionados adelantos en el campo de la regeneración muscular a partir de células madre, así como el empleo de inductores de la regeneración muscular (como, por ejemplo, la tricostatina A), o de los mecanismos que favorecen la conversión de las fibras musculares tipo II en fibras musculares tipo I (menos propensas a la degradación por acumulación de glucógeno), podrían ofrecer, en un futuro, perspectivas de curación para los pacientes afectados por la enfermedad de Pompe.

g)- TERAPIA BASADA EN EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TFEB

Como ya se ha comentado los lisosomas son orgánulos celulares implicados principalmente en los procesos de degradación y reciclaje celular. Durante la exocitosis lisosomal, los lisosomas se acoplan a la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática, vaciando su contenido fuera de la célula. La exocitosis lisosomal tiene un papel importante en la secreción celular reciclaje celular y reparación de la membrana plasmática.

Este proceso de exocitosis lisosomal requiere de dos pasos: En el primer paso, proceso independiente de Ca^{2+} , los lisosomas son reclutados a la proximidad de la superficie de la célula, mientras que en el segundo paso los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática (PM) en respuesta a una elevación de los niveles de Ca^{2+} (proceso dependiente de Ca^{2+}). De esta forma se ha comprobado que el aumento de los niveles de Ca^{2+} es un requisito imprescindible para la fusión de lisosomas con la PM, pero no para el reclutamiento de los lisosomas a la superficie celular.

Este hecho se comprobó en diversos estudios debido a que el reclutamiento de los lisosomas a la PM no se vio afectada por la depleción de Ca^{2+} , pero sin embargo, sí que se afectó la fusión lisosomal con la membrana plasmática (proceso Ca^{2+} dependiente).

Recientemente se ha descubierto que la biogénesis lisosomal, la función de degradación lisosomal y el proceso de exocitosis lisosomal son transcripcionalmente regulados por el factor de transcripción TFEB. Dicho factor TFEB, regula el proceso de exocitosis lisosomal por dos motivos:

- 1) Incrementa el número de lisosomas celulares (biogénesis lisosomal) en la proximidad de la membrana plasmática.

- 2) Promueve la fusión de los lisosomas sintetizados con la membrana plasmática. La fusión con la membrana plasmática se consigue gracias a la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular a través de la activación del canal de Ca^{2+} lisosomal (canal MCOLN1) por dicho factor de transcripción. La

activación de dicho canal permite la salida de Ca^{2+} del lisosoma al interior celular, Ca^{2+} necesario para el proceso dependiente de calcio de la exocitosis lisosomal.

La Mucopolipina 1 (MCOLN1) es un canal catiónico no selectivo lisosomal. Dicho canal favorece la liberación de Ca^{2+} lisosomal hacia el interior celular para activar la exocitosis lisosomal. Se ha demostrado que el gen que codifica el canal MCOLN1 está regulada por el factor TFEB lo que convierte a este factor en un candidato para mediar efectos sobre la exocitosis lisosomal. La localización lisosomal de MCOLN1 y sus propiedades de canal sugieren que la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular inducida por la sobreexpresión TFEB es la responsable de favorecer la exocitosis lisosomal.

Esta hipótesis se demuestra debido a que diversos estudios demuestran una elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en células con el factor de transcripción (células TFEB +), debido al papel ejercido por este factor. Para cuantificar el grado de elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular a partir del factor TFEB, se midió la concentración citoplasmática de Ca^{2+} mediante un ensayo radiométrico. Los resultados indican que además de promover la biogénesis y el reclutamiento lisosomal a la PM, el factor TFEB induce la exocitosis lisosomal mediante el aumento de los niveles de Ca^{2+} .

La sobreexpresión del TFEB en un nuevo sistema de cultivo de células de músculo y en modelos de ratón con la enfermedad de Pompe supone una reducción de la carga de glucógeno y tamaño lisosomal, mejorado el proceso autofágico, reduciendo la acumulación de glucógeno de las vesículas autofágicas, al hacer más efectivo el proceso de autofagia.

Una característica típica de la exocitosis lisosomal es la translocación de marcadores de membrana lisosomal, como el dominio luminal de LAMP1, a la membrana plasmática. Por tanto una sobreexpresión de TFEB en fibroblastos embrionarios de ratón supuso un aumento de la exposición del dominio luminal de LAMP1(marcador de membrana lisosomal) - previamente teñido- hacia la membrana plasmática, lo que reflejaba un movimiento activo de los lisosomas hacia la membrana plasmática. Esto se observó en el análisis cuantitativo por citometría de flujo ya que se mostró un aumento de la tinción LAMP1 en la membrana plasmática de las células que sobre expresaban dicho factor TFEB, lo que sugiere que el TFEB induce la exocitosis de los autofagolisosomas. Esto indica que las células responden de manera eficiente a la inducción mediada por TFEB.

Del mismo modo este hecho quedó demostrado ya que una consecuencia directa de la exocitosis lisosomal es la liberación de enzimas lisosomales en el medio del cultivo celular con el factor TFEB. Significativamente se detectaron niveles más altos de hidrolasas lisosomales en el medio de

varias líneas de células que sobreexpresan TFEB comparándolas con los medios de cultivo de las células control. El aumento de las enzimas lisosomales en el medio indica que TFEB induce la exocitosis lisosomal, de ahí la presencia de enzimas lisosomales en el medio de cultivo.

Por tanto, los experimentos en modelos de cultivo celular y animales con enfermedad de Pompe demuestran que el TFEB tiene la capacidad de eliminar las células musculares con carga excesiva de glucógeno y reducir la acumulación de desechos autofágicos.

Se ha demostrado que el número de lisosomas rellenos de glucógeno y la cantidad de glucógeno acumulado se redujeron significativamente en las fibras musculares, proporcionando así una fuerte evidencia de potencial TFEB como una diana terapéutica en la Enfermedad de Pompe.

La inducción de la exocitosis lisosomal por la sobreexpresión TFEB puede suponer un avance terapéutico en enfermedades de depósito lisosomal (EDL) en las que se ve comprometida la capacidad de degradación lisosomal de las células, como es la enfermedad de Pompe.

Este enfoque podría ser particularmente atractivo en la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II o enfermedad de Pompe de forma combinada con la terapia actualmente disponible, TSE, para revertir la patología del músculo esquelético.

6) CONCLUSIÓN

Nuestro estudio proporciona una fuerte evidencia de que, al menos en modelos animales, el empleo de nuevas terapias tales como la inducción farmacológica del factor de transcripción TFEB y activación del gen diana, el empleo de chaperonas moleculares, la terapia génica con adenovirus, la terapia por inhibición de sustrato,...podrían suponer un enfoque recientemente novedoso para las EDL, como es la enfermedad de Pompe, ya que se evitaría el problema del acceso ineficiente de la enzima humanizada de la TSE a la diana. Mediante la explotación de estas nuevas terapias en combinación con las ya usadas actualmente se lograría aumentar la capacidad de los lisosomas para expulsar su contenido hacia el espacio extracelular, permitiendo así el aclaramiento del glucógeno almacenado en el interior del lisosoma.

Se espera que en un futuro próximo estas estrategias hayan demostrado su seguridad, calidad y eficacia en humanos, permitiendo un avance en la clínica, sintomatología y calidad de vida de los enfermos con enfermedad de Pompe.

7) **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Spampanato C, Feeney E, Li L, Cardone M, Lim J, Annunziata F, et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Molecular Medicine* 2013;5(5):691-706.
- (2) Barba-Romero MA, Barrot E, Bautista-Lorite J, Gutierrez-Rivas E, Illa I, Jimenez LM, et al. Clinical guidelines for late-onset Pompe disease. *Rev Neurol* 2012 Apr 16;54(8):497-507.
- (3) Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell* 2011 Sep 13;21(3):421-430.
- (4) <http://www.fundaciongenzyme.es/Enfermedades/EnfermedadesLisosomales/EnfermedaddePompe.aspx>
- (5) Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, Cupler E, Deschauer M, Fumic K, Jackson M, Kishnani P, Lacerda L, Ledvinova J, Lugowska A, Lukacs Z, Maire I, Mandel H, Mengel E, Muller-Felber W, Piraud M, Reuser A, Rupaar T, Sinigerska I, Szlago M, Verheijen F, Van Diggelen OP, Wuyts B, Zakharova E, Keutzer J. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab* 2008; 93:275-281.
- (6) Feeney EJ, Spampanato C, Puertollano R, Ballabio A, Parenti G, Raben N. What else is in store for autophagy? Exocytosis of autolysosomes as a mechanism of TFEB-mediated cellular clearance in Pompe disease. *Autophagy* 2013 Jul;9(7):1117-1118.
- (7) Martina JA, Diab HI, Lishu L, Jeong-A L, Patange S, Raben N, et al. The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Sci Signal* 2014 Jan 21;7(309):ra9.
- (8) she KM, Taylor KM, Chu Q, Meyers E, Ellis A, Jingozyan V, et al. Inhibition of glycogen biosynthesis via mTORC1 suppression as an adjunct therapy for Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2010 Aug;100(4):309-315.