

Terapia génica ¿Memoria o esperanza?

Antonio Liras

UCM

EDITORIAL
COMPLUTENSE

Queda rigurosamente prohibida sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo público.

© 2008 by Federico Antonio Liras Martín
© 2008 by Editorial Complutense, S. A.
Donoso Cortés, 63 – 4. planta (28015) Madrid
Tels.: 91 394 64 60/1 Fax: 91 394 64 58
e-mail: ecsa@rect.ucm.es
www.editorialcomplutense.com

Primera edición: marzo 2008

ISBN: 978-84-7491-836-6

DEDICADO...

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE PUEBAN BENEFICIARSE, A MEDIO O LARGO PLAZO, DE LOS PROTOCOLOS DE TERAPIA GÉNICA Y CELULAR

Las PREMISAS

"La ciencia tiene las raíces amargas, pero muy dulces los frutos"
(ARISTÓTELES)

"EL MODO DE DAR UNA VEZ EN EL CLAVO ES DAR CIEN VECES EN LA HERRADURA" (MIGUEL DE UNAMUNO)

"La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad" (GREGORIO MARAÑÓN)

SINOPSIS DEL AUTOR



Antonio Liras (Segovia, 1955), es Vicepresidente de la Comisión Científica de la Real Fundación “Victoria Eugenia” de Hemofilia y Profesor de Fisiología en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Es Doctor en Farmacia y Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid. También es Farmacéutico Especialista en Análisis Clínicos por el Ministerio de Educación y Ciencia y Especialista Analista Clínico Europeo (“European Clinical Chemistry”) por la “European Communities Confederation of Clinical Chemistry”.

Su dedicación docente e investigadora de más de 25 años, acreditada por la Agencia Nacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación (ANECA) y la Comisión Nacional Evaluadora de la Actividad Investigadora (CNEAI), la desarrolló en prestigiosos centros de investigación como el Instituto de Enzimología y Patología Molecular —hoy Instituto de Investigaciones Biomédicas— y en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, en donde tuvo como maestro al prestigioso científico *Dr. Alberto Sols*. Posteriormente, participó en proyectos internacionales como el coordinado por la “Commission of the European Communities” para el Proyecto Genoma, y el de la “Molecular Dystrophy Association Research Department” de Nueva York, junto al prestigioso investigador en Biología Molecular de la Patología Mitocondrial, el *Dr. Stefano DiDonato*, en el Istituto Nazionale Neurologico “Carlo Besta” de Milán. Sus investigaciones en el área de la Bioquímica y la Biología Molecular le llevaron a dilucidar la estructura y regulación del gen de la carnitina palmitoil-transferasa en humanos así como a estudiar su deficiencia en algunas enfermedades de origen mitocondrial, e iniciar así el camino de su futura orientación científica en el campo de la Terapia Génica.

Su producción científica se ha traducido en la publicación de más de 30 artículos en revistas científicas de impacto internacional, en más de 100 artículos científicos y de divulgación y en 14 libros de investigación y docentes. Además ha intervenido como ponente invitado en 19 congresos nacionales y 5 internacionales con un total de participaciones en congresos de cerca de 70 comunicaciones científicas. Ha dirigido y ha sido miembro de Tribunal de varias Tesis Doctorales

El Dr. Antonio Liras ha sido miembro de Comités de Expertos del Ministerio de Sanidad y Consumo y es Vicepresidente de la Comisión Científica de la Real Fundación “Victoria Eugenia” de Hemofilia. Desde 2007 es miembro del Comité Editorial de la revista científica *Archivos de Medicina* y del Editorial Board de la revista científica internacional *International Archives of Medicine*.

Es coordinador a nivel nacional de un proyecto pionero en Terapia Génica *ex vivo* no viral para el tratamiento de la hemofilia utilizando protocolos de Terapia Génica y Terapia Celular mediante vectores no virales y células madre mesenquimales de tejido adiposo adulto en colaboración con el prestigioso investigador en Medicina Regenerativa, el *Dr. Damián García-Olmo* del Hospital Universitario “La Paz” de Madrid, y la *Dra. Concepción Tros de Ilarduya* de la Universidad de Navarra. El proyecto ha sido financiado por fondos privados, por la Real Fundación “Victoria Eugenia” de Hemofilia, los Laboratorios Baxter y por la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.

COLABORADORES



Alicia G. Gómez-Valadés

Departamento de Ciencias Fisiológicas II. Universidad de Barcelona.



Anna Vidal

Departamento de Ciencias Fisiológicas II. Universidad de Barcelona.



Antonio Bernad

Centro Nacional de Biotecnología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.



Antonio Talavera

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Consejo Superior de Investigaciones Científicas.



Buenaventura Brito

Departamento de Atención Primaria. Servicio Canario de Salud. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Ntra. Sra. de la Candelaria.



Concepción Tros de Ilarduya

Departamento de Tecnología Farmacéutica. Universidad de Navarra.



Cristina Fillat

Laboratorio de Terapia Génica. Centro de Regulación Genómica de Barcelona.



Elena Sánchez

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.



Javier Molina

Unidad de Oncohematología Pediátrica. Hospital Virgen del Camino de Pamplona.



Jordi Bermúdez

Departamento de Ciencias Fisiológicas II. Universidad de Barcelona.



José C. Perales

Departamento de Ciencias Fisiológicas II. Universidad de Barcelona.



José Luis Velázquez

Departamento de Ética. Universidad Autónoma de Madrid.



Juan Ruiz

Sociedad Española de Terapia Génica. Director Médico de Digna Biotech.



María Sagaseta

Unidad de Oncohematología Pediátrica. Hospital Virgen del Camino de Pamplona.



María Antonia Serrano

Área de Evaluación Clínica de Medicamentos Biotecnológicos y de Terapia Génica. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Consumo.



Miguel Ángel Martínez

Laboratorio de Retrovirología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Fundación IrsiCaixa.



Nuria María De Castro

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.



Rafael Castro

Departamento de Fisiología. Universidad de La Laguna. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Ntra. Sra. de la Candelaria.



Ramón Cacabelos

Centro de Investigación Biomédica EuroEspes. Director Cátedra EuroEspes de Biotecnología y Genómica. Universidad Camilo José Cela de Madrid.



Silvia Souto

Unidad de Oncohematología Pediátrica. Hospital Virgen del Camino de Pamplona.



Susana Olmedillas

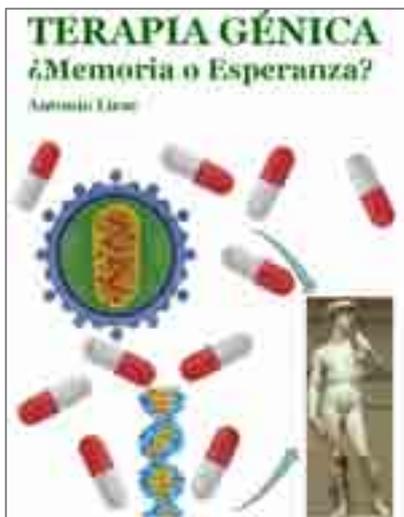
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.



Teresa Molins

Unidad de Oncohematología Pediátrica. Hospital Virgen del Camino de Pamplona.

SINOPSIS DE LA OBRA



La Terapia Génica, que podemos definir como la transferencia, en un organismo, de un fragmento de ácido nucleico —DNA o RNA— que expresa o reprime la expresión de una proteína y que de esta forma es posible sanar una determinada enfermedad, ofrece enormes posibilidades de tratar un gran número de enfermedades tanto hereditarias como infecciosas, cardiovasculares, hepáticas, neurodegenerativas o el cáncer.

Los primeros ensayos clínicos de Terapia Génica llevados a cabo en 1990 por *Anderson*, en niños “burbuja”, con el gen de la adenosina deaminasa, cuya deficiencia provoca una inmunodeficiencia combinada severa, representaron un hito histórico. Poco después, entre 1994 y 1999, el “éxtasis” del entusiasmo pasó a la decepción, debido a que los resultados prometidos, aún alcanzables, no se lograban, y porque se crearon muchas falsas expectativas a través de una

excesiva publicidad y sobre valoración de los hallazgos. Aún a pesar de este escenario científico-social, surgen, como “antídoto” neutralizante para el desencanto, nuevas ideas para tratar otras enfermedades mediante Terapia Génica como el cáncer, el SIDA o las enfermedades cardiovasculares. Era la época de las venturas y desventuras de la Terapia Génica.

En aquel momento crucial de estabilización, las alarmas se accionan de nuevo cuando en septiembre de 1999 un paciente con una deficiencia en ornitina transcarbamilasa falleció, a los 18 años de edad, en el Estado de Arizona, después de recibir un tratamiento de Terapia Génica, debido a una falta de rigor bioético. La imagen de la Terapia Génica sufre de nuevo el deterioro... y se escriben cosas como: “La terapia Génica, una pérdida de inocencia” (*Nature Medicine*, 2000); “Penosas lecciones” (*Molecular Therapy*, 2000); “Terapéutico genético, cúrate a ti mismo” (*Science*, 2000). Aún así, la ciencia en su inexorable camino de avance irreversible, hizo que en Francia *Fischer* y *Cavazzana-Calvo* curaran a cuatro pacientes con inmunodeficiencia severa combinada X1; que tres pacientes con hemofilia B pasaran de su fenotipo grave a uno moderado y que unos adenovirus alteraran el curso de un cáncer escamoso de cabeza y cuello. El nuevo siglo XXI, además, comenzaba en esos momentos a desvelar parte del genoma humano; irrumpían las células madre en el escenario científico y se identificaban nuevos genes involucrados en enfermedades que hasta entonces se etiquetaban como de etiología desconocida. Un nuevo soplo de esperanza renovaba, una vez más, a la Terapia Génica.

A pesar de todo ello, aún en el momento actual, la situación de la Terapia Génica es controvertida, fundamentalmente, por los desafortunados acontecimientos acaecidos, pero también por las propias dificultades metodológicas inherentes a este tipo de protocolos.

¿Se abandonará la Terapia Génica en el olvido como “memoria histórica” de la ciencia médica, o por el contrario, aún se mantendrá como esperanza viva, aunque más realista en cuanto a sus expectativas de éxito, con nuevas perspectivas bioéticas y legislativas, como una nueva estrategia terapéutica en distintas áreas de la medicina y la terapéutica como la oncología, las hepatopatías, las infecciones virales, las enfermedades monogénicas hereditarias, las cardiovasculares o las neurodegenerativas?

Contenido

Prólogo. Antonio Liras.

Capítulo 1. Conceptos generales sobre Terapia Génica. Antonio Liras y Susana Olmedillas.

Capítulo 2. Terapia Génica viral. La paradoja de los lentivirus. Antonio Talavera.

Capítulo 3. Vectores no virales en Terapia Génica. Concepción Tros de Ilarduya.

Capítulo 4. La intersección Terapia Génica/Terapia Celular. Nuevas perspectivas, nuevas problemáticas. Antonio Bernad.

Capítulo 5. Aplicaciones clínicas de la Terapia Celular. Nuria María de Castro y Elena Sánchez.

Capítulo 6. Células madre mesenquimales. ¿Cuál es su futuro en Terapia Génica?. Buenaventura Brito, Susana Olmedillas y Rafael Castro.

Capítulo 7. La diabetes, una enfermedad clásica metabólica para una Terapia Génica y Terapia Celular del futuro. Alicia G. Gómez-Valadés, Anna Vidal, Jordi Bermúdez y José C. Perales.

Capítulo 8. Terapia Génica en hepatopatías. Juan Ruiz.

Capítulo 9. Anemia de Fanconi. Su tratamiento por la transferencia de genes. María Sagasetta, Teresa Molins, Silvia Souto y Javier Molina.

Capítulo 10. Terapia Génica y hemofilia. Menor expresión en favor de una mayor seguridad. Antonio Liras.

Capítulo 11. La infección por el VIH/SIDA. Inhibición de la replicación viral mediante RNAs de interferencia. Miguel Ángel Martínez.

Capítulo 12. Estrategias de Terapia Génica para el tratamiento del cáncer. Cristina Fillat.

Capítulo 13. Transferencia de genes angiogénicos y antiangiogénicos. Susana Olmedillas.

Capítulo 14. Medicina genómica y Terapia Génica en las enfermedades neurodegenerativas. Ramón Cacabelos y Antonio Liras.

Capítulo 15. Normativa sobre ensayos clínicos con medicamentos de Terapia Génica. María Antonia Serrano.

Capítulo 16. Terapia Génica y Eugenesia. Una perspectiva ética. José Luis Velázquez.

Epílogo. ¿Memoria o esperanza?. Antonio Liras.

APÉNDICE I. "Websites" en Internet sobre Terapia Génica. Antonio Liras.

APÉNDICE II. "Estado del Arte" de los Ensayos Clínicos de Terapia Génica. Antonio Liras.

PRÓLOGO

Este libro representa una recopilación y actualización de la aplicación real de la Terapia Génica a determinadas enfermedades humanas de especial relevancia para la sociedad y que son más susceptibles para la aplicación de esta metodología. La colaboración de expertos clínicos e investigadores en esta nueva estrategia, garantiza la actualidad de los contenidos ofreciendo una idea veraz y realista de su ya, en determinados casos, aplicación en fases de investigación clínica o de su gran potencial para un futuro a medio o largo plazo.

Ya que este libro recopila los protocolos de mayor aplicación y más actuales de Terapia Génica para enfermedades de relevancia médico-social, en el Apéndice II se plantea el "Estado del Arte" de los ensayos clínicos más recientes, o en curso, utilizando Terapia Génica.

La Terapia Génica, que podemos definir como la transferencia, en un organismo, de un fragmento de ácido nucleico —DNA o RNA— que expresa o reprime la expresión de una proteína y que de esta forma es posible sanar una determinada enfermedad, ofrece enormes posibilidades de tratar un gran número de enfermedades tanto hereditarias como infecciosas, cardiovasculares, hepáticas, neurodegenerativas o el cáncer.

En 1990 se realizan los primeros ensayos clínicos y la Terapia Génica entra en su mayoría de edad. Los experimentos de *Anderson*, en niños "burbuja", con el gen de la adenosina deaminasa, cuya deficiencia provoca una inmunodeficiencia combinada severa, constituyeron un hito histórico. Poco después, entre 1994 y 1999, el "éxtasis" del entusiasmo pasó a la decepción porque los resultados prometidos, aún alcanzables, no se lograban, aderezado todo ello por falsas expectativas a través de una excesiva publicidad y sobrevaloración de los hallazgos. Aún a pesar de este escenario científico-social, surgen, como "antídoto" neutralizante para el desencanto, nuevas ideas para tratar otras enfermedades mediante Terapia Génica cual es el caso del cáncer, el SIDA o las enfermedades cardiovasculares. Era la época de las venturas y desventuras de la Terapia Génica.

Pero..., en aquel momento crucial de estabilización, las alarmas se accionan de nuevo cuando en septiembre de 1999 un paciente con una deficiencia en ornitina transcarbamilasa fallecía, a los 18 años de edad, en el Estado de Arizona, después de recibir un tratamiento de Terapia Génica, debido a una falta de rigor bioético. La imagen de la Terapia Génica sufre de nuevo el deterioro... y se escriben cosas como: "La terapia Génica, una pérdida de inocencia" (*Nature Medicine*, 2000); "Penosas lecciones" (*Molecular Therapy*, 2000); "Terapéutico genético, cúrate a ti mismo" (*Science*, 2000). Aún así, la ciencia en su inexorable camino de avance irreversible, hizo que en Francia *Fischer* y *Cavazzana-Calvo* curaran a cuatro pacientes con inmunodeficiencia severa combinada X1; que tres pacientes con hemofilia B pasaran de su fenotipo grave a uno moderado y que unos adenovirus alteraran el curso de un cáncer escamoso de cabeza y cuello. El nuevo siglo XXI, además, comenzaba en esos momentos a desvelar parte del genoma humano; irrumpían las células madre en el escenario científico y se identificaban nuevos genes involucrados en enfermedades que hasta entonces se etiquetaban como de etiología desconocida. Un nuevo sople de esperanza renovaba, una vez más, a la Terapia Génica.

A pesar de todo ello, aún en el momento actual, la situación de la Terapia Génica es controvertida, fundamentalmente, por los desafortunados acontecimientos ya mencionados y otros más recientes, pero también por las propias dificultades metodológicas inherentes a este tipo de protocolos.

El título del libro, "Terapia Génica ¿Memoria o Esperanza?", quiere recordar, de forma intencionada, un libro de *Mario Benedetti ("Memoria y Esperanza")*, y pretende analizar lo que se ha conseguido en los últimos 17 años en Terapia Génica desde aquel año de 1990. Pero, además, trata de concretar las perspectivas futuras de esta estrategia terapéutica en distintas áreas de la medicina y la terapéutica como la oncología, las hepatopatías, las infecciones virales, las enfermedades metabólicas, las enfermedades monogénicas hereditarias, las cardiovasculares o las neurodegenerativas. Se analizan las posibilidades reales y concretas de actuación y se intenta aclarar si la Terapia Génica se abandonará en el olvido como "memoria histórica" o si, por el contrario, aún se mantendrá como esperanza viva, aunque más realista en cuanto a sus expectativas de éxito.

Además, se tratan también los aspectos bioéticos y legislativos de este tipo de protocolos terapéuticos en tanto en cuanto su indicación y fin último son la normalización de una función fisiológica mediante la reestructuración del patrimonio genético de un individuo que se encontraba previamente alterado.

El autor

CAPÍTULO 1

Conceptos generales sobre Terapia Génica

Antonio Liras y Susana Olmedillas

La Terapia Génica es una estrategia terapéutica que se basa en modificar el patrimonio genético de determinadas células somáticas, mediante la administración de secuencias de ácidos nucleicos, cuya finalidad es “curar” tanto enfermedades de origen hereditario como de tipo adquirido.

Hoy día, la Terapia Génica es más una promesa terapéutica que una realidad aunque se lleven a cabo ya muchos ensayos clínicos con muy buenos resultados. En un futuro es posible que esta metodología revolucione la Medicina ya que va de la mano de otras disciplinas y especialidades que avanzan de forma vertiginosa como son la Biología Molecular, la Biología Celular, la Virología, la Genética, la Bioquímica, la Biofísica o las Ciencias de la Computación. La interdisciplinariedad será la clave para el desarrollo de la Terapia Génica auspiciado todo, claro está, con la información que emana de los datos del Proyecto Genoma Humano.

Los elementos clave para desarrollar un protocolo de Terapia Génica son, fundamentalmente, los vectores de transferencia que portan el “gen terapéutico” y las células diana que son aquellas que van recibir el gen. Evidentemente, las cosas no son tan simples como parecen, como se verá a lo largo de este libro, ya que existen infinidad de inconvenientes y dificultades experimentales y metodológicas para optimizar tanto los vectores como las poblaciones celulares objeto de Terapia Génica. Pero no sólo son los impedimentos metodológicos sino que también las distintas patologías a tratar tienen peculiaridades muy específicas que condicionan, en general, los protocolos de Terapia Génica que los hace sumamente particulares. Por si esto fuera poco cada paciente como individuo poblacional responde como tal, de forma individualizada y a veces radicalmente diferente a otro, aún padeciendo la misma patología y utilizando el mismo protocolo establecido al efecto. Todo esto condiciona en gran medida los protocolos de Terapia Génica especialmente en lo que respecta a la optimización de una buena relación beneficio/riesgo.

Así que vistas las cosas de esta manera se entiende el título del presente libro y la relativa “lentitud” en el logro de objetivos terapéuticos efectivos y de éxitos que hace años se están esperando.

Los antecedentes de la Terapia Génica

El camino de la evolución de la Terapia Génica hay que relacionarlo a la fuerza con el desarrollo de la Tecnología del DNA recombinante, cuyo origen hemos de buscarlo en 1869, año en que *Miescher* aislara el DNA. Este hecho no habría servido de mucho sin otros hallazgos posteriores, no menos fundamentales, como el de *Avery* en 1944 con el descubrimiento de que el DNA era el portador de la información genética que decide y define a un organismo vivo, o el descubrimiento por *Watson* y *Crick*, en 1953, de su estructura helicoidal, que abría las puertas para llegar a conocer como funcionaba en su papel no sólo de almacenar esa información sino también de transmitirla a las siguientes generaciones.

Después, otros descubrimientos como el de la DNA polimerasa por *Kornberg* en 1957; las primeras evidencias de la existencia de las enzimas de restricción por *Arber* en 1962, o el descubrimiento del Código Genético por *Nirenberg*, *Ochoa* y *Khorana* en 1966, fueron eslabones decisivos de continuidad para la dilucidación de la función del DNA y para el pleno desarrollo de la Tecnología Recombinante.

A esto siguió la puesta a punto de las técnicas de clonación de DNA por *Boyer, Cohen y Berg* (1972), los métodos de secuenciación por *Songer, Barrell y Maxam Gilbert* (1975) y el establecimiento de los ratones transgénicos por *Palmiter y Brinster* ya en la década de los años 80´ (1981). Todo ello contribuyó a allanar el camino para vislumbrar una perspectiva de futuro como es la Terapia Génica ya que se disponía de un importante arsenal de herramientas que permitía intervenir y ahondar en ese secreto, que era y sigue siendo, el patrimonio genético de un individuo. Pero como este contenido genético es responsable de la salud y la enfermedad se podía pensar en modificarlo con vistas a la curación.

Vectores de transferencia génica

Los vectores son aquellos mecanismos que llevan a cabo el proceso de transferencia de un material génico a una célula y los que aseguran su biodisponibilidad intracelular para que éste ejerza una función biológica.

Teniendo en cuenta que el papel de un vector es destinar, entregar y expresar un gen, el vector ideal sería aquel que reuniera las siguientes características: i) Una alta especificidad de destino celular a un órgano o tejido; ii) Protección del DNA frente a degradaciones enzimáticas en su transporte hasta la célula; iii) Facilidad para introducir el DNA en la célula y mantener una alta biodisponibilidad; iv) Alta eficacia de expresión del material genético; v) Baja inmunogenicidad; vi) Ningún efecto secundario adverso grave ni moderado; vii) Muy pocos efectos secundarios leves; viii) Muy alta relación beneficio/riesgo para el paciente. Evidentemente, esto es ideal y por ello el “caballo de batalla” de la Terapia Génica y a lo que se ha de tender para que esta metodología sea eficaz y sobre todo para que sea aceptada por la comunidad científica y la sociedad en general.

Actualmente, se utiliza una gran variedad de vectores en Terapia Génica y se clasifican, en general, en vectores virales y no virales. Los vectores virales son virus modificados y “manipulados” para que sin perder su capacidad infectiva para introducirse en una célula no produzcan patología. Conservan, por tanto, su capacidad para introducirse en la célula y para dirigir y expresar un gen exógeno que ya hemos llamado terapéutico. Por supuesto, presentan otras importantes desventajas que más adelante en este capítulo y a lo largo del presente libro se mencionarán. Los sistemas no virales no utilizan virus sino otros sistemas que también se estudiarán en el Capítulo 3 más exhaustivamente y que en esencia utilizan determinadas moléculas, generalmente lipídicas, a través o no de un ligando con su receptor de membrana, para introducir un gen en la célula diana. Evidentemente, aunque con una menor eficacia de transferencia, presentan una mayor seguridad para el paciente.

Vectores retrovirales (RVV)

Están basados en retrovirus que son aquellos virus constituidos por una cadena simple de RNA (genoma menor de 10 Kb) y que replican —mediante la transcriptasa en reverso— para dar una cadena doble de DNA que actúa como intermediario (provirus) (**Figura 1**). En el ciclo vital del virus existe una etapa obligatoria en que esta doble cadena de DNA se inserta en el genoma de la célula huésped, gracias a las secuencias LTR del virus, para formar parte de su material genético. Este tipo de vectores no presenta la capacidad de replicación ya que se les ha delecionado de las secuencias *gag*, *pol* y *env* que codifican nucleoproteínas que son las responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos y de los componentes de la cubierta viral. En contrapartida, al genoma viral se le incorpora el gen terapéutico. El vector retroviral, deficiente en replicación, se debe amplificar mediante su crecimiento en una línea celular especial que se llama empaquetadora y que contiene, en su genoma, las secuencias *gag*, *pol* y *env* necesarias para la replicación y empaquetamiento del virus. El vector así producido en este tipo de células y que contiene el gen terapéutico infecta a la célula diana utilizando receptores específicos y una vez en el citoplasma, la

transcriptasa en reverso transforma el RNA del vector en el DNA proviral que se integra, al azar, en el genoma de la célula infectada desde donde se expresará el producto terapéutico.

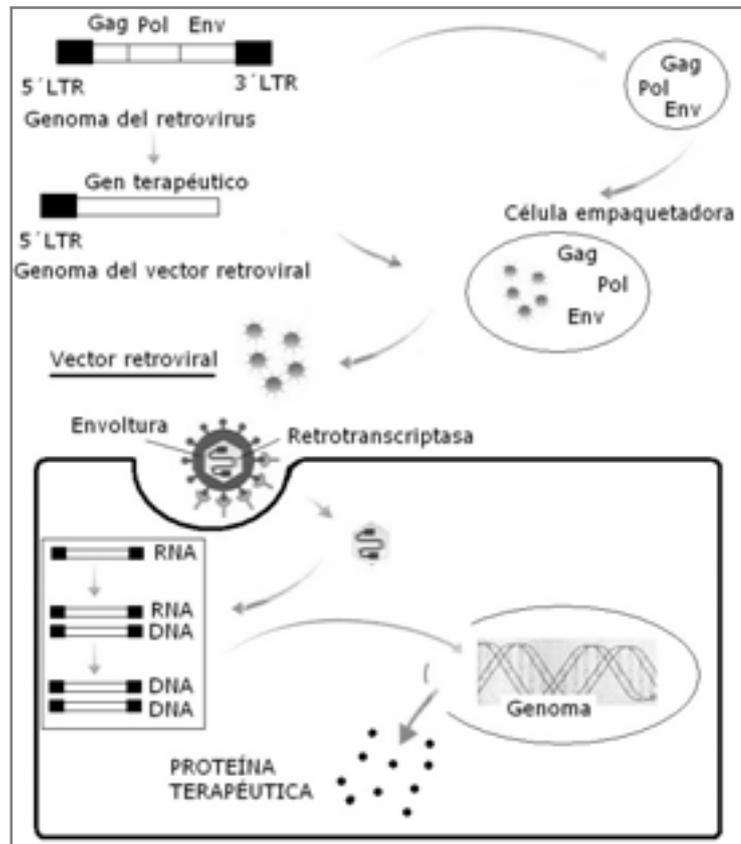


Figura 1. Mecanismo de los vectores retrovirales.

Vectores adenovirales (AdVV)

Los adenovirus presentan un genoma mayor, aproximadamente de 36 Kb, constituido por una doble cadena de DNA lineal y aunque existe una gran variedad de serotipos los más eficaces para transferir genes son el 2 y el 5 aunque otros como el 8 están dando muy buenos resultados.

El genoma de los adenovirus presenta los llamados genes tempranos E1 a E4 y otros tardíos L1 a L5. La estrategia general (**Figura 2**) para preparar vectores adenovirales se basa en eliminar las secuencias E que son las que hacen replicativo y patógeno al virus. En su lugar se coloca el gen terapéutico. Al igual que sucede con los vectores retrovirales también éstos necesitan células para su crecimiento y amplificación, células que en este caso portan las secuencias E necesarias. Posteriormente, el virus con el gen terapéutico se une a la membrana de la célula diana a través de la fibra y el pentón del adenovirus con receptores específicos. La penetración en la célula es, por tanto, mediada por receptor y una vez en el interior el endosoma se lisa para liberar el DNA que contiene. Después el DNA penetra en el núcleo y sin integrarse permanece en forma de episoma extracromosómico dirigiendo la expresión del gen terapéutico.

Vectores adenoasociados (AAV)

Los virus adenoasociados son unos virus muy pequeños y muy simples que no son autónomos. Contienen DNA 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. No se asocian con ninguna enfermedad en humanos.

Su genoma es extremadamente simple, presentando sólo dos genes, el gen *rep*, que codifica una familia de proteínas superpuestas implicadas en la replicación e integración, y el gen *cap*, que codifica una familia de tres proteínas que determinan la estructura del virus. Los extremos del genoma presentan repeticiones terminales, denominadas *TR* de unos 145 nucleótidos.

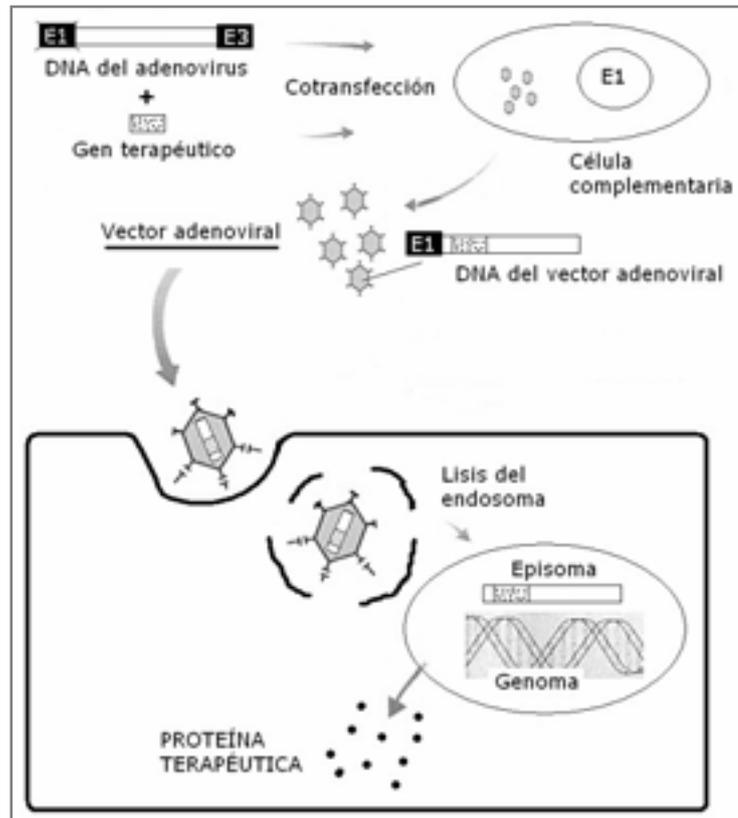


Figura 2. Mecanismo de los vectores adenovirales.

Otros vectores virales

Otros vectores son los basados en herpes virus y en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o lentivirus. Estos dos tipos de vectores solventan algunos de los problemas que se dan con los anteriores como es el tamaño del gen terapéutico, que en el caso de los herpes virus permiten introducir fragmentos muy grandes, y la capacidad de los lentivirus, conservando las ventajas de los retrovirus, de replicarse en células ya estén o no en división.

En la **Tabla I** se detallan algunas de las características diferenciales entre los vectores virales más utilizados. En primer lugar, los riesgos derivados de la utilización de un vector viral de transferencia se relacionan con su capacidad de integración en el genoma de la célula diana. Así, los retrovirus, los virus adenoasociados y los lentivirus se integran en el genoma celular por lo que existe un riesgo de mutagénesis insercional. No sucede esto con los vectores adenovirales ya que su mecanismo de actuación no incluye la etapa de integración. En contrapartida es un vector muy inmunogénico que estimula enormemente una respuesta inmunológica que inactiva al vector y es capaz de producir importantes reacciones anafilácticas a veces de consecuencias fatales para el paciente. En cuanto a la capacidad para albergar al gen terapéutico los adenovirus son los que ofrecen más

flexibilidad. Por último, a diferencia de los retrovirus, el resto pueden transfectar células tanto en división como en reposo.

Tabla I
Algunas características diferenciales entre algunos vectores virales

VECTOR VIRAL	RIESGOS	INTEGRACIÓN	CAPACIDAD (Kb)	ESTADO DE LAS CÉLULAS DIANA
Retrovirus (RNA)	Mutagénesis	Sí	<4-8	En división
Adenovirus (DNA)	Inmunogenicidad	No	36	En división/no-división
Adenoasociados (DNA)	Mutagénesis	Sí	<4	En división/no-división
Lentivirus (RNA)	Mutagénesis	Sí	<4-8	En división/no-división

Otras estrategias utilizando ácidos nucleicos

Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ácidos nucleicos que se diseñan de forma específica para unirse a determinadas secuencias de DNA y formar lo que se llama DNA triplex. En otros casos se forman los llamados heteroduplex RNA-DNA. Los oligonucleótidos antisentido son complementarios de secuencias específicas de un determinado RNA mensajero. La formación de un heteroduplex bicatenario sentido-antisentido de este tipo bloquea la traducción a proteína. Las estrategias antisentido tienen un gran potencial terapéutico para inhibir la expresión de genes en patologías tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas como el SIDA. Sin embargo, su utilización en clínica no se logra implantar ya que presentan una vida media en plasma muy corta lo que impide su acceso funcional al citoplasma y al núcleo celular.

La reparación génica con oligonucleótidos es una estrategia destinada a reparar genes que presentan una mutación puntual conocida activando selectivamente los mecanismos celulares de reparación del DNA. Para ello se diseñan oligonucleótidos específicos para secuencias genómicas adyacentes al lugar de la mutación, en cuyo extremo el oligonucleótido lleva un agente capaz de lesionar el DNA, mediante la formación de un enlace covalente con el nucleótido responsable de la mutación.

Otra estrategia es la utilización de las llamadas ribozimas que son aquellas moléculas de RNA que presentan una actividad enzimática y que utilizan al RNA como sustrato. Esta actividad enzimática se basa en la ruptura y ligamiento de las cadenas de RNA en sitios específicos.

Por último otra estrategia novedosa son los RNAs de interferencia que se estudiarán más en detalle en el Capítulo 11 de este libro. El fenómeno de la interferencia mediada por RNA, también denominado silenciamiento del RNA, se asemeja al sistema inmune en que su función natural es la de proteger al genoma contra la invasión de elementos genéticos móviles tales como los transposones y los virus. La interferencia mediada por RNA es un mecanismo celular altamente conservado de silenciamiento génico post-transcripcional. Desde su descubrimiento en 1998, el estudio más detallado de su mecanismo bioquímico ha puesto de manifiesto que pequeñas moléculas de RNA de doble cadena desencadenan la degradación citoplasmática de RNAs mensajeros homólogos. Estos pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) pueden sintetizarse artificialmente e introducirlos de modo exógeno, o bien, ser producidos de forma endógena mediante la transcripción y procesamiento de genes de microRNA (miRNA). Las funciones intrínsecas del RNA de interferencia, en particular las de los miRNAs, se sabe que son de gran alcance, y fundamentales para procesos celulares básicos durante el desarrollo, así como en tejidos diferenciados y en diversas patologías. La activación exógena de la vía de interferencia mediada por RNA

utilizando siRNA sintético, o bien expresado a partir de plásmidos o vectores virales, es imprescindible para el silenciamiento génico y tiene un potencial terapéutico significativo.

Aunque todavía se trata de una estrategia emergente, la modificación del RNA ofrece la posibilidad de solventar algunos inconvenientes de la Terapia Génica, como la baja eficiencia de transferencia génica, la limitación en el tamaño de los transgenes, la mutagénesis insercional asociada a la integración de los vectores virales, y la respuesta inmune o la toxicidad debida a los mismos. El prometedor potencial del RNA de interferencia, como modalidad terapéutica, reside en su mecanismo celular intrínseco y en su elevada especificidad de secuencia. De este modo, el RNA de interferencia permite el desarrollo de diversas estrategias terapéuticas a partir de la Terapia Génica convencional. A parte del silenciamiento de genes cuya actividad está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades, por ejemplo el VIH, el virus de la hepatitis B, la degeneración macular, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer, la especificidad de secuencia del RNA de interferencia permite también el silenciamiento dirigido de isoformas concretas producidas por "splicing" alternativo y de alelos mutantes patogénicos.

Vectores no virales

Los vectores no virales, que se estudiarán en detalle en el Capítulo 3, no utilizan virus para la transferencia de genes ya que se basan en rodear de alguna forma al DNA mediante vesículas o elementos, en general, de carácter lipofílico. El sistema más habitual es el basado en liposomas (**Figura 3**), de tal forma que la bicapa lipídica engloba al DNA y facilita su transporte y paso a través de las membranas celulares.

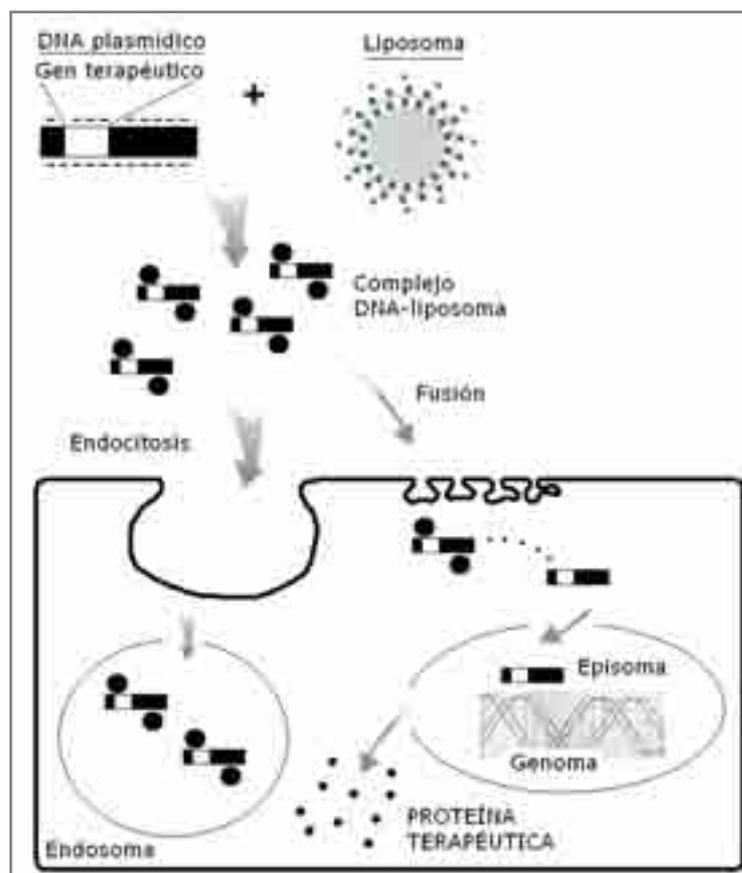


Figura 3. Vectores no virales.

A su vez estos sistemas pueden ser o no mediados por receptor en cuyo caso se enlazan al sistema lipídico, determinadas moléculas que encuentran un receptor específico de membrana lo que facilita enormemente su paso a través de la membrana de la célula diana.

Estos sistemas frente a la gran ventaja de su baja toxicidad y nula inmunogenicidad presentan en contra una baja eficacia de transferencia y un menor tiempo de expresión del gen terapéutico. Aún así se deberá, como se comentará más adelante en este libro, tener en cuenta la consideración muy minuciosa de lograr un equilibrio entre eficacia y tiempo de expresión génica y la relación riesgo/beneficio de los distintos tipos de vector en determinadas patologías.

El complejo DNA-lípido es secuestrado y degradado en una gran proporción en los endosomas pero otra parte llega al núcleo donde, en forma de epicromosoma, dirige la expresión del gen terapéutico.

Estrategias terapéuticas de Terapia Génica

La transfección de una célula diana con un vector y la forma de llevarse a cabo la acción terapéutica del gen expresado, se puede desarrollar mediante Terapia Génica *ex vivo* o mediante Terapia Génica *in vivo*.

Terapia Génica *ex vivo*

Esta forma de Terapia Génica se basa en que previamente a la transfección con el vector se extraen células del propio paciente procedentes de un tejido o de un órgano (**Figura 4**). Posteriormente, y tras la disgregación del tejido y el mantenimiento del cultivo celular *in vitro*, se realiza la transfección de las células (generalmente seleccionadas como población homogénea) con el vector adecuado que porta el gen terapéutico. Entre los métodos de transfección son de utilidad en este caso los métodos no virales como los químicos mediante fosfato cálcico; los físicos como la electroporación, microinyección o bombardeo de partículas; los métodos de fusión mediante complejos DNA-liposomas y los métodos de endocitosis mediada por receptor mediante complejos DNA-proteína, DNA-cápside viral o inmunoliposomas. Por supuesto son altamente eficaces los vectores virales como los retrovirus, los adenovirus y los adenoasociados.

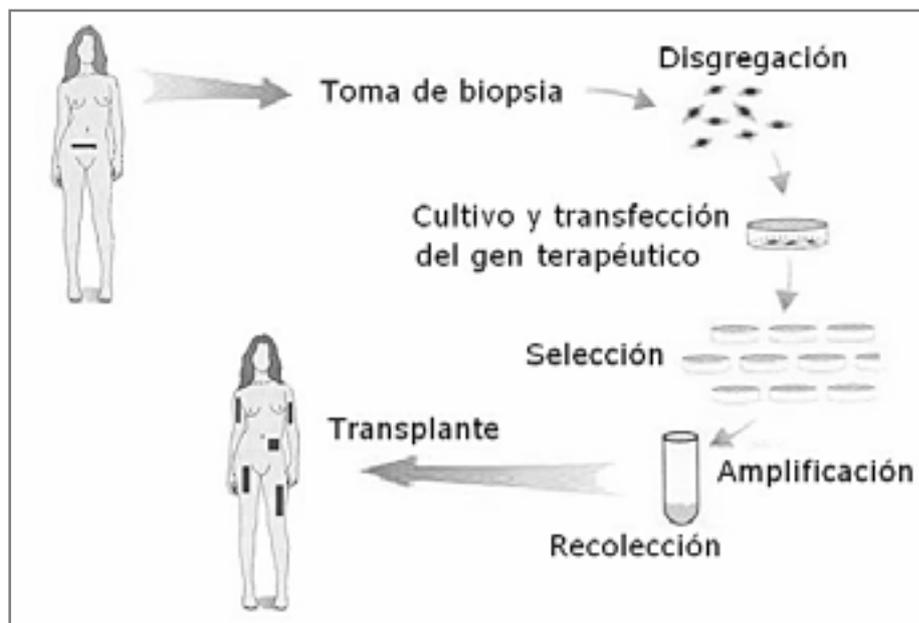


Figura 4. Terapia Génica *ex vivo*.

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.

Terapia Génica in vivo

Esta forma de Terapia Génica se basa en la administración de forma sistémica al paciente de la construcción génica constituida por el vector y el gen terapéutico (**Figura 5**).

La forma de transfección es, generalmente, mediante vectores virales, aunque se está ensayando con éxito la utilización de complejos DNA-liposomas y DNA desnudo o complejos DNA-proteína mediado por receptor. En ocasiones y en función de la patología a tratar, el vector puede ser o no destinado. El vector destinado es aquel que presenta tropismo tejido-específico y es de utilidad cuando la enfermedad tiene su origen en un determinado tejido como puede ser el caso de la hemofilia o un tumor localizado. En esos otros casos en que la enfermedad es sistémica como puede ser el caso de neoplasias metastásicas puede ser de mayor utilidad la utilización de vectores no destinados o sistémicos.

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 pueden ser irreversibles ya que su administración es sistémica a diferencia de la Terapia Génica *ex vivo* que permite retirar el implante o el injerto y de esa forma eliminar la fuente de distribución del vector.

Células diana

En Terapia Génica definimos célula diana como aquella que es susceptible de ser transfectada por un vector ya sea viral o no viral y que además es capaz de expresar y de secretar el producto génico expresado a partir de un gen terapéutico.



Figura 5. Terapia Génica *in vivo*.

La célula diana ideal para desarrollar un protocolo de Terapia Génica será aquella que proceda de un tejido fácilmente extraíble del organismo, se cultive y se amplifique cómodamente y sea fácilmente transfectable y reimplantable. Estas son las condiciones

ideales de una célula diana para llevar a cabo una Terapia Génica *ex vivo* y en este sentido son esperanzadores los fibroblastos de la piel y el tejido adiposo, que reúnen todas estas características. Desafortunadamente, la eficacia de transfección en estos tejidos no es la suficiente por lo que se debe recurrir, en muchas ocasiones, a desarrollar una estrategia *in vivo*. En el caso de una Terapia Génica *in vivo*, se podrán utilizar vectores virales o no virales sobre tejidos *in vivo* como puede ser la inyección intrahepática o intramuscular para vectores dirigidos o la inyección intravenosa para vectores no destinados. Estas son tan solo directrices muchas veces teóricas porque los factores para que se dé un protocolo ideal de Terapia Génica son muy variables y muchas veces la flexibilidad en el establecimiento de un protocolo es la única norma.

Otro tipo más específico de célula diana son los llamados linfocitos infiltrantes en tejidos (TILs) que son linfocitos transfectados con determinados genes que junto con interleuquina 2 —factor de crecimiento de linfocitos— se infiltran en tumores sólidos y son capaces de producir la apoptosis de células tumorales.

Por último, y será un tema que se abordará exhaustivamente en varios capítulos del presente libro, el futuro de la Terapia Génica es posible que esté en las células madre adultas y embrionarias. Así, las células madre hematopoyéticas se muestran esperanzadoras para la deficiencia de adenosina deaminasa, la Enfermedad de Gaucher o la Granulomatosis Crónica, y los mioblastos, que son las células madre de tejido muscular, lo pueden ser para la Distrofia Muscular de Duchenne. Por otra parte, las células madre mesenquimales, que se estudian en el Capítulo 6, son otro tipo de células diana muy atractivo que comienza a ser utilizadas en protocolos de Terapia Génica. La idea general de la utilización de células madre adultas y embrionarias es que estas células se puedan transfectar con vectores menos tóxicos y más seguros para el paciente y que gracias a sus características de diferenciación y especialización se pueda mantener más a largo plazo la expresión de un gen en niveles terapéuticos.

Terapia con células modificadas genéticamente

La modificación génica de diferentes tipos celulares, en particular de las células madre, está abriendo la posibilidad de desarrollar aplicaciones terapéuticas de estas células en áreas como la autoinmunidad, las lesiones del sistema nervioso central, las enfermedades óseas o articulares, el cáncer o el infarto de miocardio. Buen ejemplo de ello son las distrofias musculares, enfermedades que carecen actualmente de cura. Para éstas, los resultados con vectores virales adenoasociados son los más prometedores. Asimismo, la administración sistémica de oligonucleótidos antisentido ha tenido un gran éxito induciendo la expresión de distrofina y la exclusión de exones ha mejorado la patología muscular en modelos caninos de distrofia. El músculo distrófico también ha mostrado una importante mejoría bioquímica y funcional al transplantar células madre miogénicas modificadas genéticamente. Del mismo modo, la inyección intravenosa de células precursoras mieloides derivadas de médula ósea, en las que se había introducido el gen del receptor TREM2, disminuyó la destrucción tisular y facilitó la reparación del sistema nervioso central en un modelo murino de esclerosis múltiple, mejorando los síntomas clínicos mediante la reducción del daño axonal y previniendo una desmielinización posterior.

Las células madre derivadas de músculo son aplicables en la regeneración del cartílago articular, hueso y músculo esquelético. Estas células pueden modificarse genéticamente para secretar factores de crecimiento importantes en la reparación de tejidos, actuando por tanto como reservorios implantables de larga duración de estas moléculas. Estas evidencias sugieren que las células madre derivadas de músculo son apropiadas para la Terapia Génica y su aplicación en patologías musculoesqueléticas. Esta población de células multipotenciales, aislada también a partir de tejido adiposo y médula ósea, ha demostrado que las células madre adultas modificadas con genes osteogénicos permiten reparar fracturas y favorecer una rápida formación de hueso *in vivo*, probablemente debido a una

acción tanto autocrina como paracrina en las células del huésped, que potencia el efecto osteogénico.

La porfiria eritropoyética congénita es una enfermedad autosómica recesiva severa caracterizada por la deficiencia de la enzima uroporfirinógeno III sintasa (UROS), perteneciente a la ruta biosintética del grupo hemo. Recientemente se ha desarrollado un modelo murino en el que la aplicación de células madre hematopoyéticas transfectadas con el cDNA del gen UROS humano mediante lentivirus, permitió una corrección completa de la enfermedad a nivel fenotípico, metabólico y enzimático de larga duración. En esta misma línea se han utilizado células epiteliales amnióticas humanas inmortalizadas, en las que se introdujo mediante un vector adenoviral el gen de la beta-glucuronidasa, para tratar la mucopolisacaridosis tipo VII en modelos murinos.

Las células madre mesenquimales (MSCs) también pueden ser modificadas genéticamente para aplicarlas en el tratamiento del cáncer y en inmunomodulación. Bajo una estimulación apropiada, las MSCs pueden comportarse como potentes células presentadoras de antígenos, y se están llevando a cabo estudios a cerca de la producción de IL2 por estas células como agente anticancerígeno. Los tumores cerebrales son muy agresivos y su tratamiento es difícil debido a su localización, pero en los últimos años, se están logrando esperanzadores avances mediante el trasplante de células madre neurales modificadas genéticamente para producir moléculas antitumorales, y que tienen la capacidad de migrar hacia el tumor, reduciendo su volumen.

La terapia con células modificadas genéticamente se ha aplicado también a las patologías cardíacas, como el infarto de miocardio. Por ejemplo, la infusión intravenosa de células madre mesenquimales transfectadas con vectores retrovirales, que sobre expresan la quimioquina CXCR4, se ha utilizado para promover la llegada de células progenitoras a los tejidos isquémicos y, por tanto, la reparación tisular. El modelo, desarrollado en ratas, muestra una estrategia terapéutica útil, segura y no invasiva para el tratamiento post-infarto. De forma similar, el trasplante de células madre neurales humanas que sobre expresan VEGF en modelos murinos de hemorragia intracerebral, constituye un posible tratamiento para este tipo de accidente cerebrovascular, al favorecer la angiogénesis en el cerebro huésped y la recuperación funcional en estos animales.

Riesgos de la Terapia Génica

Aunque parece sobre el papel extremadamente sencillo introducir un gen en un organismo gracias a las técnicas de ingeniería genética de las que hoy disponemos, la cuestión es que la naturaleza vela por el mantenimiento de su patrimonio genético —que a la postre es funcional— de una manera sorprendente.

Los riesgos que se derivan de la aplicación de un protocolo de Terapia Génica emanan siempre del vector bien porque éste tiene efectos adversos *per se*, bien porque afecta y llega a la línea germinal (células reproductoras) del individuo.

La experiencia acumulada de los distintos estudios de investigación básica preclínica en modelos animales y cultivos celulares así como en estudios en curso de fases clínicas, han demostrado que los vectores virales al interferir de forma directa en el patrimonio genético de la célula pueden provocar efectos adversos muy graves, graves y moderados que se han de tener en cuenta más, quizás, que en cualquier otro tipo de ensayo farmacológico. Esto es así por los propios mecanismos de defensa que la naturaleza y el individuo disponen para rechazar y enfrentarse a una agresión contra el material genético que es, en definitiva, el que controla todas y cada una de las funciones fisiológicas e incluso la propia conservación de la especie. Es, por tanto, que el panorama se presenta poco alentador pero no por eso imposible de abordar.

Los principales riesgos derivados del vector de transferencia génica son fundamentalmente cuatro. Por una parte y derivado de lo que se denomina recombinación genética —proceso sin lugar a dudas natural y con una finalidad de protección— los vectores pueden provocar la inducción de determinados genes que bien pueden ser proto-oncogenes u oncogenes. En segundo lugar, los vectores pueden integrar su material genético dentro del genoma celular y producir procesos de mutagénesis insercional. En estos dos casos la inducción de procesos neoplásicos mediante la desdiferenciación y transformación celular ante una agresión de este tipo puede estar asegurada. En tercer lugar, existe la posibilidad, como así se ha demostrado aunque en muy pocos casos, que el vector alcance la línea germinal lo que abre la gran incertidumbre de que los cambios introducidos pasen a las siguientes generaciones con un carácter evidente de amplificación de los riesgos anteriormente comentados. En cuarto lugar, algunos vectores virales que presentan la ventaja de no producir mutagénesis insercional sí son altamente inmunogénicos, es decir, que estimulan una importante respuesta del sistema inmune frente al virus introducido y que en algunos casos puede suponer un riesgo anafiláctico no menos importante y que en determinadas circunstancias clínicas del paciente puede ser fatal.

Ante esta situación será preciso encontrar o diseñar un vector menos “ambicioso” en cuanto a los niveles y duración de la expresión pero que en contrapartida ofrezca una mayor seguridad para el paciente receptor.

Referencias

- Aspectos éticos de la Terapia Génica en humanos.** Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/hgn/v10n1/16walter.shtml
- Aspectos generales sobre Terapia Génica.** Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml
- Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, Liu X, Li Y, Ward CA, Melo LG, Kong D (2008)** Targeted Migration of Mesenchymal Stem Cells Modified With CXCR4 Gene to Infarcted Myocardium Improves Cardiac Performance. *Mol Ther*, [En prensa] [Consultado el 10/03/2008] Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253156?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Dwain I, Xiangpeng Y, Zeng Z, Patricia T, Joh S Y (2006)** Neural stem cells--a promising potential therapy for brain tumors. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1: 79-84.
- Friedmann T (2000)** Medical ethics. Principles for human gene therapy studies. *Science* 287: 2163-5.
- Friedmann T (2000)** Changing roles for academia and industry in genetics and gene therapy. *Mol Ther*, 1: 9-11.
- Friedmann T (2001)** A history of gene therapy. *Mol Ther*, 4: 284. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.nature.com/mt/journal/v4/n4/pdf/mt2001231a.pdf>
- Gates CB, Karthikeyan T, Fu F, Huard J (2008)** Regenerative Medicine for the Musculoskeletal System Based on Muscle-derived Stem Cells. *J Am Acad Orthop Surg*, 16: 68-76.
- Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D (2007)** Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng*, 13: 1135-50.
- Kimmelman J (2005)** Clinical review: Recent developments in gene transfer. Risk and ethics. *BMJ*, 330: 79-82. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/330/7482/79>
- Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU (2007)** Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. *PLoS ONE* 1(e156): 1-14. [Consultado el 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1764718&blobtype=pdf>
- Liras A (2001)** La biología de los virus al servicio de la futura Terapia Génica. Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.biologia.org/?pid=5001&id=40>
- Mendez-Pertuz M, Hughes C, Annenkov A, Daly G, Chernajovsky Y (2006)** Engineering stem cells for therapy. *Regen Med*, 1: 575-87.
- Metodología del DNA recombinante y transferencia de genes.** Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www4.od.nih.gov/oba/Rdna.htm>
- Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M, Okuyama T, Sakuragawa N (2006)** Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med*, 209: 23-32.
- Pomme S, Galipeau J (2006)** The use of mesenchymal stromal cells in oncology and cell therapy. *Bull Cancer* 93: 901-7.
- Robert-Richard E, Moreau-Gaudry F, Lalanne M, Lamrissi-Garcia I, Cario-André M, Guyonnet-Dupérat V, Taine L, Ged C, de Verneuil H (2008)** Effective gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria is facilitated by a survival advantage of corrected erythroid cells. *Am J Hum Genet*, 82: 113-24.
- Shin JH, Takeda S (2007)** Therapeutic strategy for muscular dystrophies. *Brain Nerve*, 59: 415-24.

Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H (2007) TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med*, 4(e124): 675-89. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1851623&blobtype=pdf>

Talavera A, Sánchez H, Martín R, Liras A (2004) *Terapia Génica*. Ed. Ephemera. Madrid (Spain).

Wood M, Yin H, McClorey G (2007) Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet*, 3(e109): 845-54. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1904251&blobtype=pdf>

CAPÍTULO 2

Terapia Génica viral. La paradoja de los lentivirus

Antonio Talavera

Según Russell (1), "Terapia Génica" es un término que puede aplicarse a cualquier procedimiento terapéutico (curativo) en el que se *introducen genes* en *células somáticas* humanas. Esta definición, que no es sino una de muchas que se han formulado hasta la fecha, engloba cuatro conceptos clave: Introducción, gen, célula diana y somático.

El primero de los conceptos clave nos señala ya de entrada que uno de los componentes fundamentales de la Terapia Génica es el método usado para que los genes puedan ser introducidos en las células. El proceso de suministro de material genético exógeno a una célula con el fin de que los genes contenidos en él se transcriban y traduzcan, es decir, que se expresen, es conocido como transgénesis. El gen cuya expresión se intenta obtener mediante este proceso, ya sea con fines terapéuticos o simplemente analíticos, suele ser conocido, a lo largo del proceso con el nombre de "transgén".

La pregunta inmediata es: ¿Cómo es posible llevar a cabo este suministro? Sólo en casos excepcionales, el material genético puede ser introducido directamente en la célula a la que está destinado, en cuyo caso se le denomina "DNA desnudo". No obstante, la situación más común es que, a fin de que su entrada en la célula sea eficiente, dicho material genético se debe encontrar formando parte de determinadas estructuras encargadas de su transporte, llamadas, por ello, "vectores de transgénesis" (2).

La necesidad de vectores responde a la presencia de obstáculos que se oponen al proceso de transgénesis. Estos obstáculos pueden estar presentes en el exterior de la célula, como por ejemplo, en el supuesto de que la transgénesis tenga lugar en el organismo, es decir, *in vivo*, y así la presencia de nucleasas en el medio extracelular hace inviable el uso del material genético desnudo. Un problema adicional es que el vector no hace, en general, distinciones entre las células idóneas para la transgénesis y otras células, con lo que gran parte del material que contiene el transgén va a ser desperdiciado en el interior de aquellas células en las que, incluso en el supuesto de que sean capaces de expresarlo, y, por tanto, no se obtendrá el efecto deseado.

Pero no son éstas las únicas barreras que se oponen a una transgénesis efectiva. Una vez que ha llegado a la célula diana el material genético se encuentra con la barrera fisiológica más inmediata, la membrana plasmática, que delimita lo que es el ámbito celular impidiendo la entrada indiscriminada de material externo al citoplasma celular. Existen maneras naturales y artificiales para conseguir que el material genético sobrepase esta barrera, pero, desgraciadamente, está presente la siguiente "trampa" tendida por la célula al material que consigue "colarse": los lisosomas, destino casi obligado de las partículas que entran en la célula por medio de invaginaciones de la membrana plasmática que, una vez internalizados reciben el nombre genérico de endosomas. En efecto, estas vesículas citoplasmáticas, experimentan, a lo largo del tiempo y mediante su unión con otras vesículas endógenas, cambios en su contenido enzimático y en su pH que permiten la digestión de los materiales incluidos en ellas.

Aún cuando el vector empleado sea capaz de eludir la acción de los lisosomas, el material genético debe entrar en el núcleo de la célula, ya que es en este compartimento celular donde se encuentra la maquinaria enzimática para que pueda llevarse a cabo la expresión de los genes aportados. Para lograr esto, se debe atravesar la última de las barreras físicas, la envuelta nuclear que, en general, sólo deja paso libre a moléculas muy pequeñas o que posean un mecanismo específico para traspasar a través de los poros nucleares presentes en dicha envuelta.

Es obvio, pues, que el diseño de cualquier vector de transgénesis ha de tener en cuenta la necesidad de sobrepasar todos estos obstáculos. La naturaleza ofrece muchos mecanismos de evasión de estas barreras en el ciclo biológico de los diferentes tipos de virus. En efecto, estos microorganismos, al ser parásitos celulares obligados han tenido, en su evolución, que optimizar los mecanismos necesarios para que su material genético sea expresado en el interior de la célula y, en su inmensa mayoría, en el núcleo. Es por esto que los primeros vectores de transgénesis que se diseñaron se basaron en la modificación de diferentes virus, recibiendo este tipo de vectores la denominación genérica de “vectores virales” (3,4). En otro capítulo de este libro se tratará detalladamente el otro tipo de vectores que no utilizan componentes virales a los que se conoce como “vectores no virales” y que presentan diferentes ventajas e inconvenientes, cuando se los compara con los vectores virales. Se puede decir que, en general, los vectores virales garantizan la evasión de todos los obstáculos anteriormente enumerados excepto la transgénesis de células no deseadas (cuando el proceso tiene lugar *in vivo*), de manera espontánea, mientras que los vectores no virales tienen que ser diseñados *ex-profeso* para este fin.

Si se analizan los distintos experimentos clínicos de Terapia Génica desde el nacimiento de esta técnica hasta el año 2007, el uso de vectores no virales (DNA desnudo, lipofección, transferencia directa de RNA) alcanza el 26,5% de todos los vectores usados, mientras que los vectores virales suman, entre todos, el 66,6%, es decir, las dos terceras partes del total. Dentro de los vectores virales existe una clara competencia entre los adenovirales y los retrovirales, habiendo aquellos sobrepasado a los segundos en el último año. Siguen en importancia otros virus de los que más tarde se hablará.

Vectores adenovirales

Los vectores adenovirales basan su existencia en los adenovirus (5,6), virus respiratorios aislados por primera vez en 1953 por Rowe del tejido adenoidal nasofaríngeo humano. Son virus de forma regular icosaédrica, sin envuelta (**Figura 1**), de 120 nm de diámetro, cuya cápsida está compuesta por 252 capsómeros. Doce de dichas subunidades tienen simetría pentámera (pentones) y se colocan en los 12 vértices del icosaedro; de su base pentónica emerge una fibra que tiene un papel importante en el proceso de entrada del virus en la célula huésped. Las caras del icosaedro están formadas por 20 grupos de 12 subunidades exónicas (de simetría exámera). A todas estas proteínas principales se agregan otras secundarias que estabilizan la partícula viral o virión.

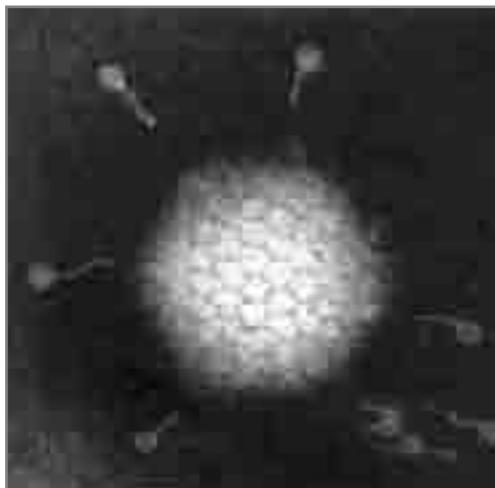


Figura 1. Imagen de un adenovirus obtenida por microscopía electrónica.

En el interior de la partícula se encuentra el material genético, consistente en un DNA bicatenario de 36 Kb, que codifica unas 2700 proteínas virales.

Los genes correspondientes a dichas proteínas se distribuyen en grupos, 4 de ellos E1 a E4, de expresión temprana (antes de la replicación del genoma viral), y 5 (L1 a L5) de expresión tardía, una vez replicado el DNA. En la **Figura 2** puede verse la localización de los diferentes grupos de genes, así como la dirección de transcripción respecto al origen de coordenadas arbitrario en uno de los extremos del DNA. La zona ampliada muestra que entre los nucleótidos 0 y 103 existe una zona llamada de "repetición terminal invertida" o ITR, cuyo nombre obedece a que en el otro extremo de cada cadena está presente la secuencia complementaria. Entre los nucleótidos 194 y 380 aparecen secuencias necesarias para que los DNAs virales sean empaquetados en cápsidas durante el proceso de ensamblaje de los virus progenie. La entrada del virus tiene lugar mediante la unión de las fibras a receptores específicos en la membrana plasmática, seguida de la invaginación de esta, con lo que el virus entrante queda englobado en un endosoma que logra romper antes de entrar en la vía lisosomal. Una vez en el citoplasma entra en el núcleo, donde pierde la cápsida y comienza la expresión de los genes tempranos necesaria tanto para la replicación del DNA como para la expresión de los genes tardíos, muchos de los cuales codifican las proteínas virales que se ensamblan para producir, una vez encapsulado el DNA recién replicado, las partículas virales correspondientes a la progenie.

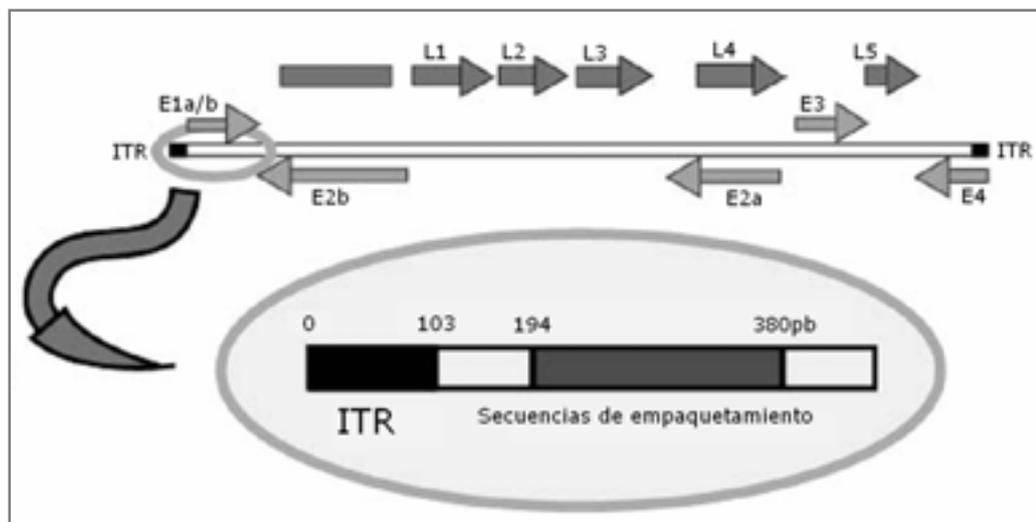


Figura 2. Esquema del genoma de un adenovirus, con las zonas de transcripción temprana (E) y tardía (L). El cerco ampliado muestra las zonas de control cercanas al extremo de la molécula de DNA (2).

Ciertas características de los adenovirus, tales como el gran tamaño de su genoma, capaz de albergar transgenes de gran longitud, la presencia extracromosómica de su DNA en el núcleo de la célula —estado calificado como "episomal"—, así como el conocimiento de numerosos serotipos en los adenovirus humanos, hicieron que estos virus fueran contemplados como fuente de vectores de transgénesis, especialmente para Terapia Génica. En una primera generación de vectores adenovirales, el transgén era insertado en un plásmido que contenía la región del extremo izquierdo del DNA viral, precisamente en el sitio del gen temprano E1. Este plásmido se introducía, por electroporación, en una estirpe celular humana que expresaba constitutivamente dicho gen, junto con la mayoría de la parte derecha del DNA viral, de manera que ambas zonas virales, la contenida en el plásmido y portadora del transgén y la que contenía el extremo derecho, solapasen. La presencia de la zona de solapamiento permitía que se generase, mediante recombinación homóloga, un DNA viral de longitud completa y portador del transgén. La expresión en la célula de todos los genes virales permitía la formación de partículas de adenovirus capaces de transducir el transgén.

Estos primeros vectores provocaban reacción inmune, debido a que la inactivación de E1 no abolía completamente la expresión, en las células transducidas, de los genes tardíos. Tras una segunda generación de virus en que se trató de inactivar otros genes tempranos —con poco éxito—, se diseñaron nuevos vectores en los que se abolieron todos los genes estructurales del DNA viral, dejando sólo las zonas necesarias para la replicación y encapsidación del DNA. Estos vectores de tercera generación o vectores vacíos (7) necesitan, para su formación, detalles de ingeniería genética adicionales relativos a la expresión, en las células encargadas de la formación de los virus recombinantes o transductores, de genes virales que aunque son capaces de dar lugar a las proteínas de la cápsida se encuentran inhabilitados para su encapsidación.

Vectores adenoasociados

Los virus adenoasociados, icosaédricos sin envuelta, de 18-26 nm de diámetro, pertenecen al género *Dependovirus*, dentro de la Familia *Parvoviridae*, cuyo nombre se refiere al pequeño tamaño de las partículas. Su simplicidad genética determina que cuando infectan una célula la infección no sea productiva de nuevos virus a menos que la misma célula sea infectada, en ese momento o en otro posterior, por otro virus más poderoso genéticamente, que preste las funciones de las que el parvovirus carece y que, generalmente, es un adenovirus —de ahí el nombre de adenoasociados— (**Figura 3a**).

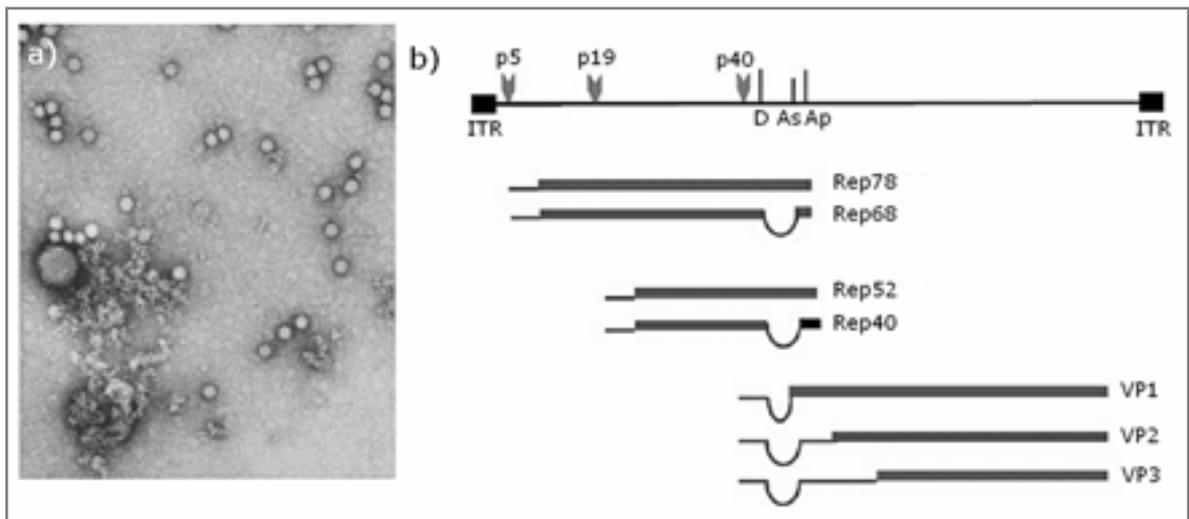


Figura 3. a) Microfotografía electrónica de una preparación de virus adenoasociados, acompañados por un adenovirus auxiliar. b) Esquema del genoma del virus adenoasociado. Las flechas verticales señalan la posición de los promotores (2).

Su genoma consiste en un DNA de cadena simple de 4680 nucleótidos, con regiones terminales invertidas de 145 nucleótidos. Este genoma contiene tan sólo 3 fases abiertas de lectura que, comenzando en tres promotores diferentes solapan entre sí, y dan lugar a 7 proteínas, ya que cada uno de los 3 RNAs mensajeros pueden sufrir, o no, procesos de corte y ligamiento ("*splicing*") diferentes (**Figura 3b**). En ausencia del virus auxiliar, los virus adenoasociados pueden integrar su genoma en sitios determinados del genoma celular, de donde son rescatados cuando tiene lugar la infección por el virus auxiliar. Esta presunta capacidad de integración específica se cita comúnmente como una de las ventajas de estos virus para la preparación de vectores, aunque en la mayoría de los casos dicha especificidad es abolida como consecuencia del proceso de vectorización.

La preparación de virus adenoasociados portadores de un transgén (8) requiere disponer de un genoma viral clonado en el que todas las secuencias del genoma viral, excepto las ITR y las zonas no codificantes adyacentes a éstas, hayan sido sustituidas por el transgén. Esta construcción se introduce en las células junto con otros dos plásmidos portadores de los

genes auxiliares del adenovirus y los genes estructurales del virus adenoasociado, respectivamente, que, como en el caso anterior, han sido inhabilitados para su encapsidación. El único DNA empaquetado en las partículas virales formadas por la célula así tratada será el que corresponde a los virus adenoasociados recombinantes.

El principal inconveniente de este tipo de vectores es, dado su pequeño tamaño, la imposibilidad de transducir genes de tamaño superior a 5 Kb, aunque se ha apelado, a veces, a trucos basados en señales de "splicing" o recombinación homóloga para que dos mitades de un transgén, aportada cada una de ellas por un adenoasociado diferente, se combinen en el interior de la célula.

Vectores basados en herpes virus

Los herpes virus constituyen un grupo de virus con DNA bicatenario, de unos 1500 pares de bases, dividido en dos secciones, U_L y U_S de distinto tamaño, y flanqueadas por sendas repeticiones terminales invertidas. Ambas secciones pueden disponerse de forma directa o invertida una con respecto a la otra. La partícula consiste en una cápsida icosaédrica rodeada de un tegumento —adquirido en el paso del virus por el sistema de Golgi en su camino de salida de la célula—, que a su vez se rodea de una envuelta viral (**Figura 4**).

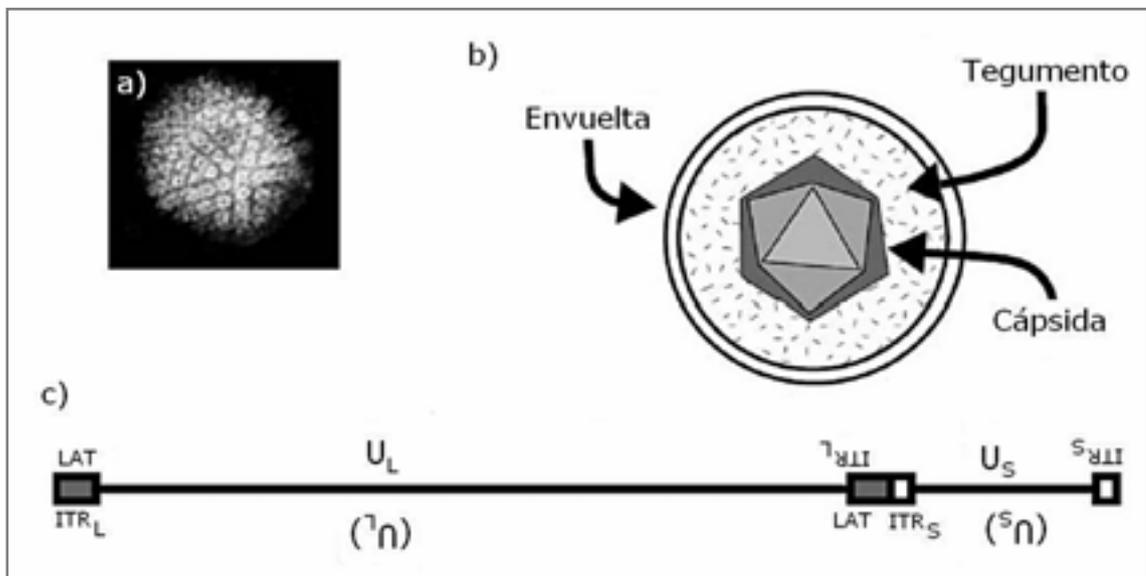


Figura 4. a) Microfotografía electrónica del virus herpes simplex. b) Esquema de una partícula completa con envuelta, tegumento y cápsida. c) Esquema del genoma del herpes virus, señalando las secciones larga y corta, los correspondientes ITRs y la localización de los genes responsables de la latencia de la infección viral (2).

El genoma de los virus herpes de tipo 1 contiene unos 75 genes, de los cuales, aproximadamente, 35 son esenciales para el ciclo viral, mientras que el resto del genoma lo constituyen genes accesorios, en el sentido de que su inactivación no afecta a la infectividad del virus, por lo que pueden ser sustituidos por genes celulares. Destaca la presencia de la zona LAT responsable del estado de latencia que alcanza el virus durante largos períodos.

La infección por virus herpes tiene lugar en células epiteliales, siendo los virus originados en esta infección primaria los que alcanzan las terminaciones nerviosas sensoriales para después ser transportados a lo largo del axón hasta el núcleo neuronal, donde, merced a la acción de los genes de la zona LAT entran en estado latente, quedando en forma extracromosómica hasta que algún tipo de estímulo (inmunosupresión, estrés, fiebre, ciertas enfermedades) reactivan la fase lítica. Al final de ésta, los viriones emergen del núcleo y son transportados por el axón hasta la terminación nerviosa, donde tiene lugar una nueva infección aparente (y recurrente), cerca del sitio de la infección primaria.

La capacidad de los herpes virus para infectar neuronas ha determinado el desarrollo de los correspondientes vectores (9) para una futura Terapia Génica de enfermedades que afectan al sistema nervioso tanto central como periférico, desde tumores hasta enfermedades degenerativas, pasando por el tratamiento del dolor crónico.

Retrovirus y sus vectores derivados

La Familia *Retroviridae* se clasifica actualmente en 7 géneros, cinco de los cuales se engloban, por su capacidad de producir tumores sólidos o leucemias, en un grupo que recibe el nombre de *Oncoretrovirus*. A éstos se suman el género *Lentivirus*, llamado así por el curso lento de su infección, y el género *Espumavirus*, nombre que obedece al aspecto vacuolado de las células infectadas por este tipo de virus que, por otra parte, no producen ningún tipo de patología aparente.

Los retrovirus son virus con envuelta, de unos 100 nm de diámetro. En el interior se encuentra la nucleocápsida que contiene el material genético complejo con proteínas. La envuelta contiene proteínas específicas de origen viral que son las que se unen al receptor celular en el momento de la infección y otras proteínas de origen celular que permanecen al emerger la partícula viral de la célula, por gemación (**Figura 5**).

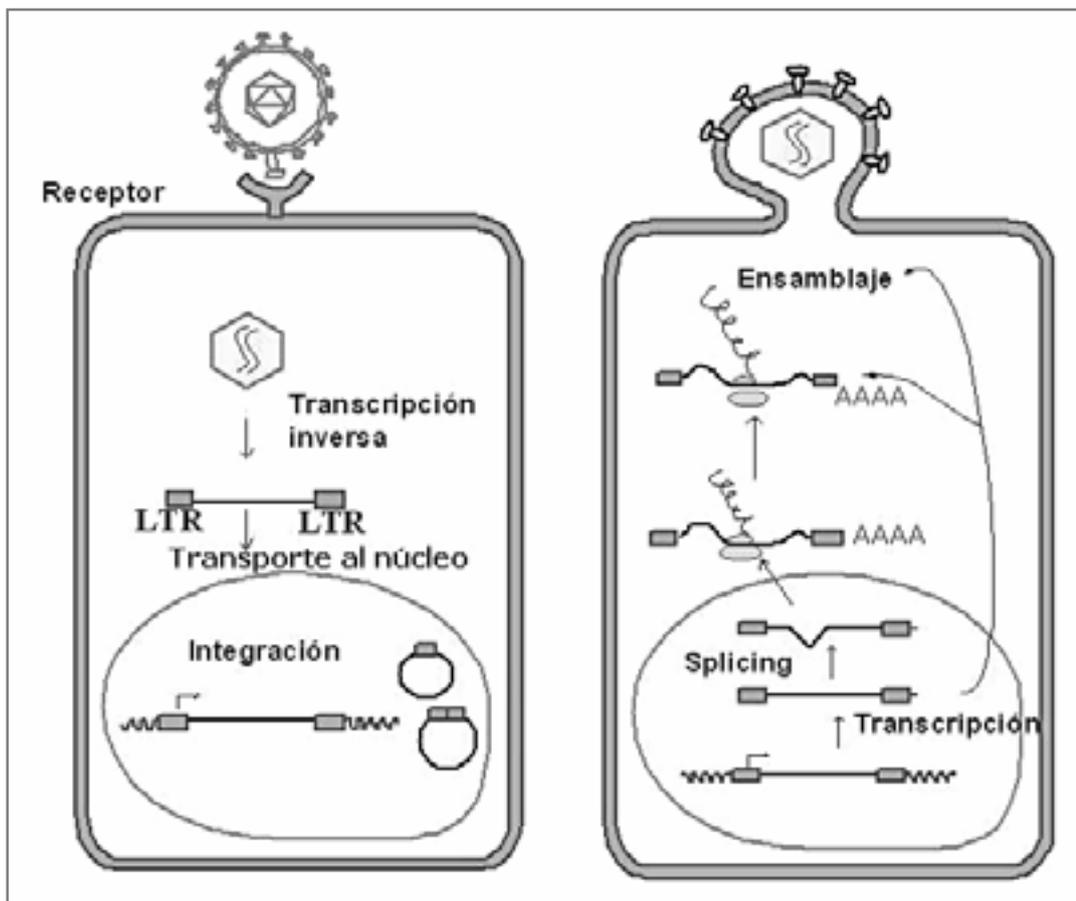


Figura 5. Ciclo biológico de la infección por retrovirus. La parte izquierda comprende las fases tempranas de la infección, desde la entrada del virus a la integración del provirus. La parte derecha comprende las fases tardías que van desde la transcripción del provirus a la salida de las nuevas partículas por gemación.

El material genético contenido en las partículas retrovirales está constituido por dos moléculas de RNA. El genoma del virus se guarda en la célula infectada como un DNA

integrado en el DNA celular, desde donde se expresan los genes virales para dar lugar a los virus progenie. Esta paradoja es debida a que tras la entrada de los virus en la célula —proceso que necesita al menos dos componentes de la superficie celular, receptor y correceptor—, el RNA unicatenario viral, con el concurso de la enzima transcriptasa inversa (RT) contenida en el virus, se transforma en un DNA bicatenario mediante un complejo proceso de síntesis en el que la molécula de RNA, aunque lineal, se comporta como si sus extremos estuviesen unidos, es decir, como una circunferencia virtual. Ambas cadenas de DNA, negativa (-) y positiva (+) comienzan su síntesis en lugares precisos del genoma y la cadena (-) se copia directamente del RNA viral, utilizando como cebador un tRNA celular. La cadena (+) es una copia de la cadena (-) y utiliza como cebador un resto del RNA viral que ha ido degradándose en el proceso de copia. En el DNA bicatenario están presentes todas las secuencias del RNA, algunas de las cuales se repiten, en disposición directa, a ambos lados de la nueva molécula constituyendo las estructuras llamadas “repeticiones terminales largas” o LTRs.

Este DNA no sólo ha de tener acceso al núcleo para poder expresar sus genes, sino que, además, ha de integrarse en la cromatina nuclear. Para este fin, otra enzima del virus, la integrasa (IN), acompaña al DNA desde el momento de su síntesis, y se encarga de cortar el DNA celular en determinados lugares, cuya naturaleza preferente depende de la especie viral, con el fin de acoplar a dicho corte el empalme del DNA viral, que queda en el llamado estado de provirus.

Todos los retrovirus, sin excepción, contienen tres genes principales llamados “canónicos”, que codifican las proteínas estructurales de la cápsida (gen *gag*), las enzimas RT e IN (gen *pol*), y las proteínas virales de la envuelta (gen *env*). De cada uno de estos genes se expresa una poliproteína que, una vez el virus sale de la célula, y por la acción de la actividad proteásica de una de ellas, se resuelve en dos o varios componentes, durante el proceso conocido como maduración. Estos genes se expresan a partir del provirus, con el concurso de la maquinaria celular de transcripción, y a partir de un promotor que se encuentra en los LTRs. Solamente el LTR izquierdo es operativo para el provirus; el contenido en el LTR derecho es tan solo un recuerdo del pasado del RNA de la molécula pero, una vez insertado el provirus, puede activar otros genes que queden adyacentes a él.

El retrovirus más conocido y publicitado hoy día es el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH), agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida o SIDA. Anteriormente, el modelo de retrovirus correspondía al virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), a partir del cual se diseñaron los vectores virales de Terapia Génica más usados en experimentación y en la clínica durante muchos años. La preparación de dichos vectores ha seguido pautas diversas, todas ellas necesitadas de un elemento central, el plásmido llamado “vector retroviral genómico”, que incluye un provirus en el que los 3 genes estructurales, han sido eliminados y sustituidos por el transgén (**Figura 6**).

Las demás regiones no codificantes, entre las que se incluyen no sólo los LTR sino también otras secuencias necesarias para el correcto funcionamiento de la transcripción reversa para la encapsidación del RNA (zona ψ), se conservan en este vector plasmídico. Esta construcción se introduce en una célula apropiada junto con otros plásmidos que aportan los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, que al expresarse forman partículas virales en las que se encapsida exclusivamente el RNA procedente del vector retroviral genómico, ya que los otros plásmidos no poseen ninguna región de empaquetamiento.

Un inconveniente que presentan los vectores derivados del MoMLV es que son incapaces de transducir células que se hallan en estado de reposo. Ello es debido a que el DNA viral, cuya síntesis tiene lugar en el citoplasma, no posee mecanismos específicos de entrada en el núcleo, por lo cual ha de esperar a que la célula infectada entre en mitosis —momento en el que se desintegra la envuelta del núcleo— para entrar en contacto directo con el material nuclear. Una situación diferente la ofrecen los *Lentivirus* y, por lo tanto, los vectores basados en su ciclo biológico (10). En efecto, los virus de este género poseen en el DNA

recién sintetizado una característica que no se encuentra en los *Oncoretrovirus* y es que hacia su parte media existe una zona de 88 nucleótidos en la que una de las cadenas de DNA está representada dos veces (**Figura 7**), con lo que dicha zona actúa como una triple hélice.

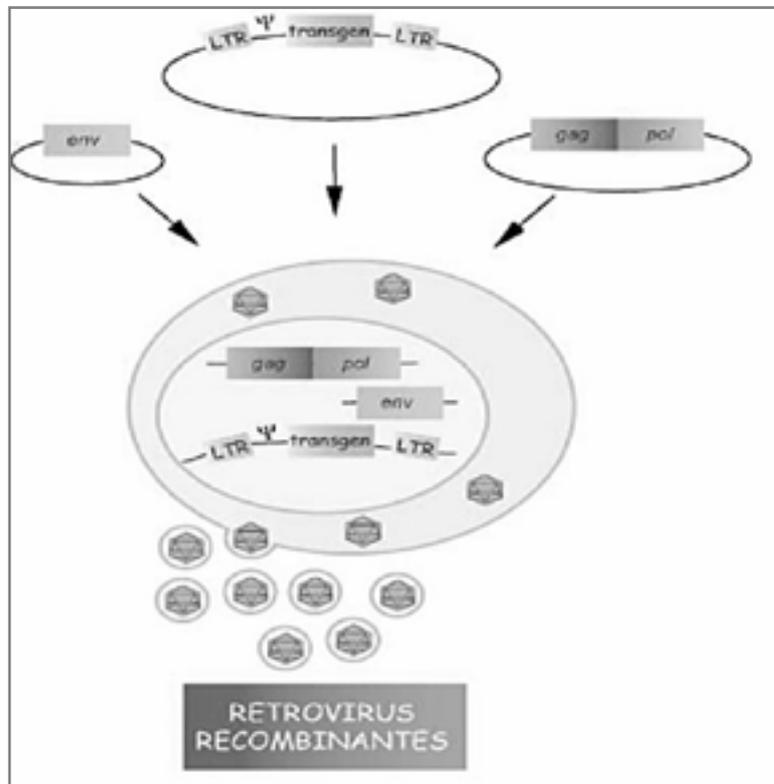


Figura 6. Preparación de retrovirus recombinantes transductores mediante cotransfección con tres plásmidos. Nótese que solamente el plásmido portador del transgén entre dos LTR (vector retroviral genómico) incluye una secuencia de empaquetamiento de RNA (ψ) (2).

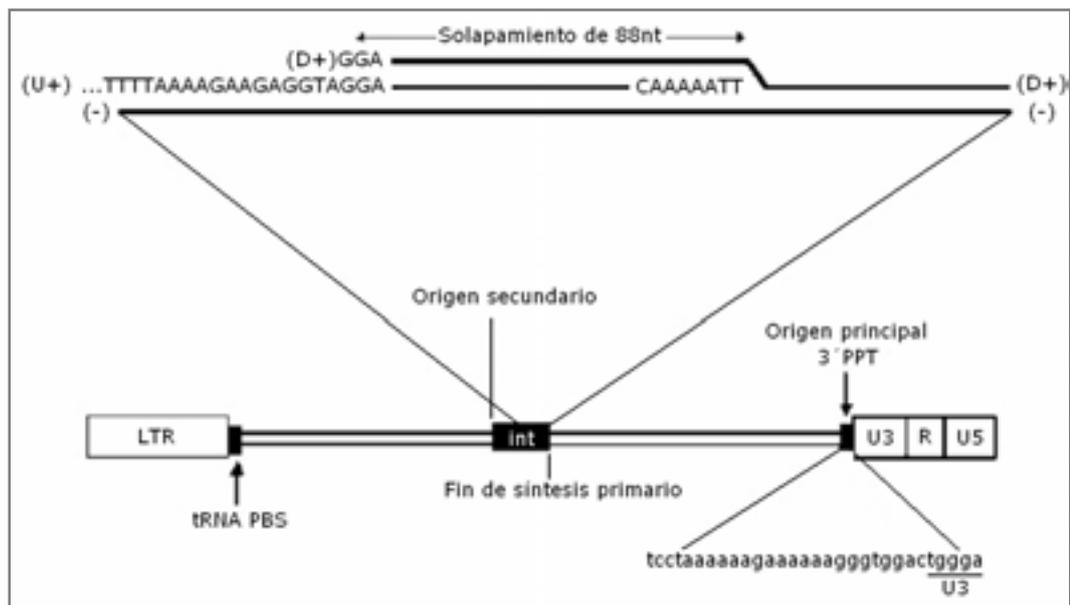


Figura 7. "Solapa central" del DNA pre-proviral del virus de la leucemia felina (adaptado Ref. 11).

Esto es así porque la cadena de DNA (+) se sintetiza a partir de dos orígenes, en lugar de hacerlo a partir de uno sólo, como sucede en los *Oncoretrovirus*. Además, el DNA sintetizado a partir del primer origen, o principal, (hacia la derecha y pasando de un extremo a otro de la circunferencia virtual de la que se hablaba) continúa su elongación por encima del origen secundario hasta que, 88 nucleótidos más adelante, encuentra una señal de terminación, lo que determina el solapamiento señalado. Esta estructura facilita el plegamiento del DNA y su acomplejamiento con proteínas que facilitan su paso a través de los poros nucleares (12,13).

La preparación de vectores basados en *lentivirus* (14,15) requiere conocer otras características diferenciales de este grupo. A pesar de que el VIH ha representado y todavía continua siendo un peligro epidemiológico desde el punto de vista sanitario y de Salud Pública, éste virus patógeno ha sido, a pesar de todo, el primer *lentivirus* empleado en el diseño de este tipo de vectores —¡la paradoja de los *lentivirus*!—.

El SIDA como patología fue descrito en 1981 en los Estados Unidos, como consecuencia de una serie de casos de neumonía, cuya aparición fue más próxima en el tiempo de lo que cabía esperar en términos estadísticos y epidemiológicos. Alertadas las autoridades sanitarias de aquel país se observó que la raíz de aquella “epidemia” era una enfermedad inmunosupresora, y la neumonía era tan solo uno de los síntomas que se podían derivar de tal condición, siendo el más general (y causa de todos los demás) un descenso progresivo del nivel de linfocitos CD4⁺. Otros síntomas eran: infecciones por protozoos, bacterias o levaduras; linfomas y sarcomas; manifestaciones neurológicas, etc., que aparecían después del largo período de latencia típico de las infecciones por *lentivirus*. Pronto se vio que el contagio tenía lugar por vía sexual y, finalmente, en 1984, se describió el agente que causaba la enfermedad —un retrovirus— que resultó ser el tercer *lentivirus* humano descrito, después de que en 1977 se describieran dos que causaban leucemias.

Un detalle del ciclo del VIH a tener en cuenta tanto en cuanto a su epidemiología como a la hora del diseño de vectores es que para su entrada en la célula necesita un receptor y un correceptor. El receptor es precisamente la proteína de superficie CD4 que identifica a los linfocitos CD4⁺ (linfocitos *helper* o auxiliares), aunque también está presente en otras células del sistema inmune, como los macrófagos, que en determinadas circunstancias pueden servir de reservorio del virus, lo que explica las recidivas que aparecen tras la interrupción de los tratamientos antirretrovirales. Una vez el virus se ha unido al receptor, su entrada en la célula no tiene lugar sino con el concurso de otro tipo de moléculas, también presentes en la membrana celular, que normalmente sirven de receptores para citoquinas, y entre las que se encuentran moléculas como CCR5 o CXCR4.

Otra característica del virus del SIDA es que, además de los tres genes “canónicos”, su genoma presenta una serie de genes, llamados accesorios, cuya acción en el curso de la infección viral hay que tener en cuenta a la hora de diseñar vectores, ya que algunos de ellos son imprescindibles para la síntesis del RNA, mientras que la presencia de otros podría determinar que los vectores no fuesen operativos. Estos genes se denominan *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr* y *vif* (**Figura 8**). Las secuencias de muchos de estos genes solapan entre sí o con las de otros genes. Además, los genes *tat* y *rev* no son continuos, necesitando de “*splicing*” para su expresión.

Aplicaciones recientes de los vectores lentivirales

El desarrollo de los vectores lentivirales ha llevado en los últimos dos años a estudios de Terapia Génica aplicada a tejidos cuyas células no se encuentran normalmente en división (16), como es el caso de muchas células del sistema nervioso (17,18), con el objeto último de tratar enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer, o sobre los islotes de Langerhans, con el fin de detener el progreso de destrucción de las células beta, causa principal de la diabetes de tipo I (19,20). Otro tejido candidato es el

muscular, en el caso de la distrofia muscular (23), o las células madres hematopoyéticas, en la hemofilia (21) o la anemia de Fanconi (22). También se ha estudiado la posible aplicación de los vectores lentivirales en la Terapia Génica del cáncer (24,25), idóneos especialmente en la consecución de inmunoterapia mediada por células dendríticas (26).

Sin embargo, la aplicación de los vectores lentivirales en la que se ha puesto quizás más esfuerzo es la que termina de completar la paradoja referida anteriormente: *la aplicación de vectores basados en el VIH para combatir al propio SIDA*. En efecto, esta enfermedad afecta a diversos tipos de células que derivan de las células madres hematopoyéticas por lo que su Terapia Génica puede ser más efectiva y duradera si se aplica a estas células precursoras en lugar de hacerlo empleando como diana células diferenciadas. Además, el reservorio principal del virus son los macrófagos, células diferenciadas a término y que han perdido su capacidad de división. En ambos tipos de células los vectores lentivirales son los de elección a la hora de introducir genes que puedan neutralizar o interrumpir el ciclo infeccioso del VIH.

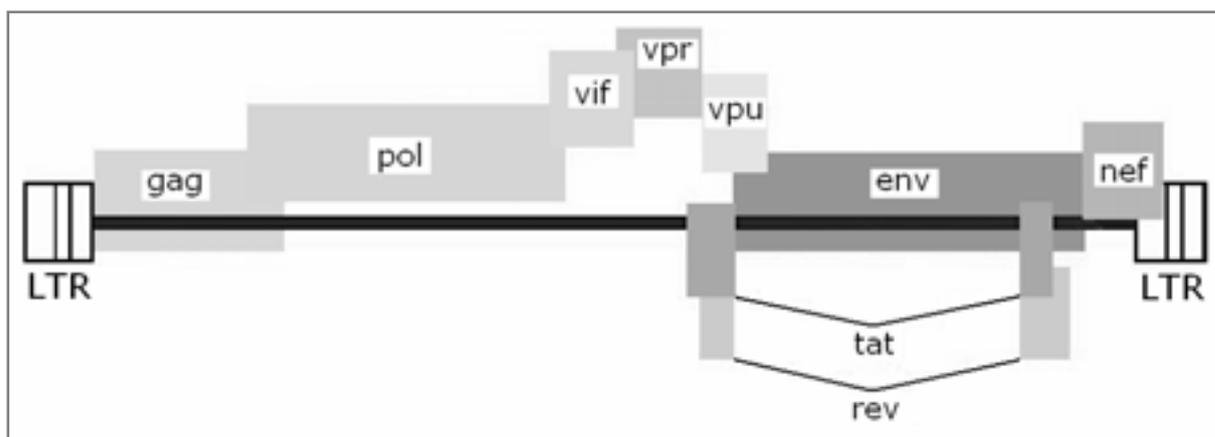


Figura 8. Esquema del genoma del VIH (2).

Por ejemplo, se muestran esperanzadores los señuelos (“*decoys*”) que se unen engañosamente a proteínas virales, no permitiéndoles alcanzar las moléculas auténticas sobre las que ejercen su función; tal es el caso del señuelo Tar (27-29). Una proteína, la proteína TAT, se une normalmente a los RNAs virales nacientes por una secuencia presente en éstos que es la secuencia *Tar*, unión sin la cual no se completa la síntesis de dicho RNA. El señuelo es un gen que al transcribirse produce en la célula una gran cantidad de pequeños RNAs con la secuencia *Tar*, de manera que las moléculas de TAT quedan secuestradas y sin acceso a los RNAs virales que las necesitan, hecho que bloquea el desarrollo del virus.

Otros tipos de genes terapéuticos utilizados son los que codifican las ribozimas que son RNAs de carácter enzimático que destruyen a otros RNAs de manera específica, al reconocerlos como complementarios (28). También se muestran de utilidad los RNAs antisentido capaces de bloquear la traducción de un mRNA que sea complementario, pero sin provocar su destrucción, como en el caso de las ribozimas (30). O los RNAs capaces de provocar el fenómeno de interferencia (31,32). Algunas de estas estrategias se han combinado para lograr una mayor eficacia de neutralización del virus (33).

Referencias

1. Russell SJ (1997) Science, medicine, and the future. Gene therapy. BMJ, 315: 1289-92.
2. Talavera A, Sánchez H, Martín R, Liras A (2004) Terapia Génica. Ed. Ephemera. Madrid (Spain).
3. Talavera A, Martín F, Sánchez H (1996) Los virus en la terapia génica. Virología 4: 3-15.
4. Talavera A, Sánchez H (2004) Nuevos sistemas virales en Terapia Génica. Virología 10: 1-16.
5. Roy-Chowdhury J, Horwitz MS (2002) Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. Mol Ther, 5: 340-4.
6. Alba R, Bosch A, Chillón M (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Ther, 12 (Suppl 1): S18-S27.

7. Gonçalves MAFV (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector *Virology J*, 2: 43-59.
8. Borenstein R, Singer O, Moseri A, Frenkel N (2004) Use of amplicon-6 vectors derived from human herpesvirus 6 for efficient expression of membrane-associated and -secreted proteins in T cells. *J Virol*, 78: 4730-43.
9. Talavera A, Liras A, Fuentes L, Sánchez H (2000) El VIH y otros retrovirus complejos en la Terapia Génica de células en reposo. *Virología* 7: 2-15.
10. Saenz DT, Poeschla EM (2004) FIV: From lentivirus to lentivector. *J Gene Med*, 6: S95-S104.
11. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101: 173-85.
12. Van Maele B, De Rijck J, De Clercq E, Debysers Z (2003) Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol*, 77: 4685-94.
13. Connolly JB. (2002). Lentiviruses in general therapy research. *Gene Ther*, 9: 1730-4.
14. Lever AM, Strappe PM, Zhao J (2004) Lentiviral vectors. *J Biomed Sci*, 11: 439-49.
15. Sinn PL, Sauter SL, McCray PB (2005) Gene therapy progress and prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors design, biosafety, and production. *Gene Ther*, 12: 1089-98.
16. Janas J, Skowronski J, Van Aelst L (2006) Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons. *Meth Enzymol*, 406: 593-605.
17. Jakobsson J, Lundber C (2006) Lentiviral vector for use in the central nervous system. *Mol Ther*, 13: 484-91.
18. Dowd E, Monville C, Torres EM, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND, Dunnett SB (2005) Lentivector-mediated delivery of GDNF protects complex motor functions relevant to human Parkinsonism in a rat lesion model. *Eur J Neurosci*, 22: 2587-95.
19. Kobayashi N, Arata T, Okitsu T, Ikeda H, Kobayashi K, Kosaka Y, Narushima M, Tanaka N, Lakey JR (2004) Transduction of human islets with the lentiviral vector. *Transplant Proc*, 36: 2203-4.
20. Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE, Wilson JM (2004) Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 15: 211-9.
21. Kootstra NA, Matsumura R, Verma IM (2003) Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. *Mol Ther*, 7: 623-31.
22. Yamada K, Ramezani A, Hawley RG, Ebell W, Arwert F, Arnold LW, Walsh CE (2003) Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector. *Mol Ther*, 8: 600-10.
23. Li S, Kimura E, Fall BM, Reyes M, Angello JC, Welikson R, Hauschka SD, Chamberlain JS (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther*, 12: 1099-108.
24. Painter RG, Lanson NA, Jin Z, Park F, Wang G (2005) Conditional expression of a suicide gene by the telomere reverse transcriptase promoter for potential post-therapeutic deletion of tumorigenesis. *Cancer Sci*, 96: 607-13.
25. Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, Tulimaki K, Ketola A, Tenhunen A, Salonen T, Wahlfors J (2004) Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol*, 25: 1753-62.
26. Dullaers M, Thielemans K (2006) From pathogen to medicine: HIV-1 derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy. *J Gene Med*, 8: 3-17.
27. Banerjee A, Li MJ, Remling L, Rossi J, Akkina R (2004) Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34⁺ progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages. *AIDS Res Ther*, 1: 2.
28. Mi MY, Zhang J, He Y (2005) Inhibition of HIV derived lentiviral production by TAR RNA binding domain of TAT protein. *Retrovirology* 2: 71. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1308866&blobtype=pdf>.
29. Lu X, Yu Q, Binder GK, Chen Z, Slepishkina T, Rossi J, Dropulic B (2004) Antisense-mediated inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by use of an HIV type 1-based vector results in severely attenuated mutants incapable of developing resistance. *J Virol*, 78: 7079-88.
30. Rosas MF, Talavera A (2006) Virus, Terapia Génica y RNA interferente. *Virología* 11: 51-63.
31. Anderson J, Akkina R (2005) HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Res Ther*, 132: 1.
32. Chang LJ, Liu X, He J (2005) Lentiviral siRNAs targeting multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther*, 12: 1133-44.
33. Li MJ, Kim J, Li S, Zaia J, Yee JK, Anderson J, Akkina R, Rossi JJ (2005) Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol Ther*, 12: 900-9.

CAPÍTULO 3

Vectores no virales en Terapia Génica

Concepción Tros de Ilarduya

Los vectores no virales sintéticos se han desarrollado como una alternativa para superar muchos de los problemas de seguridad asociados a los vectores virales. En último extremo, el desarrollo completo de un vector no viral implicaría, entre otros aspectos, la equiparación de los niveles en cuanto a eficacia de los vectores virales, limitando al máximo sus inconvenientes.

La Terapia Génica no viral considera el desarrollo de las moléculas de un DNA terapéutico como si se tratase de un producto biofarmacéutico, que debe ser administrado en su forma farmacéutica adecuada para que sea activo, seguro y estable. A esa medicina que utiliza esa forma farmacéutica se le denomina medicina génica. Su objetivo es conseguir formulaciones del DNA que permitan a los genes ser administrados directamente a los pacientes, utilizando procedimientos tradicionales que consigan dirigir el DNA terapéutico a las células diana y expresar el gen de forma controlada dentro del organismo. Así, la medicina génica puede proveer al organismo de cualquier proteína terapéutica, incluyendo las que tienen efectos autocrinos, paracrinos o endocrinos. Se trata de desarrollar sistemas sintéticos que imiten las funciones de los virus como vectores de transferencia génica, pero con una mayor seguridad.

La tecnología farmacéutica ha ganado experiencia en relación con los sistemas avanzados de administración de fármacos. En concreto, el desarrollo de sistemas sintéticos para la liberación controlada y la vectorización de fármacos ofrecen un fundamento al desarrollo de la Terapia Génica no viral. Estos sistemas incluyen: los lípidos catiónicos, los liposomas, agentes condensantes de diversa naturaleza y vectores poliméricos como nanopartículas y micropartículas.

La mayoría de los vectores no virales están basados bien en la encapsulación, o bien en la condensación del ácido nucleico en partículas por interacción electrostática con los agentes condensantes (en general cargados positivamente), con el objeto de proteger al DNA de la degradación y facilitar su entrada en la célula. Para conseguir la transferencia del ácido nucleico a la célula mediada por un vector no viral, es necesaria la consecución de una serie de etapas que incluyen la preparación del vector, la interacción con la membrana plasmática e internalización celular, el paso por el endosoma (en algunos casos), la migración a través del citoplasma, la entrada al núcleo y la liberación del ácido nucleico de forma disponible. En la liberación de los ácidos nucleicos *in vivo* existen obstáculos adicionales que deben ser superados, entre los que se incluyen barreras fisiológicas, interacciones inespecíficas con los fluidos biológicos, la matriz extracelular y las células no diana. Finalmente, es necesario que se produzca el reconocimiento y la internalización lo más específica posible en las células diana, y al mismo tiempo se debe evitar en lo posible la entrega no específica del gen y los efectos secundarios adversos.

Conviene señalar, que en la transferencia génica no viral habitualmente no existe integración del gen terapéutico en el genoma de la célula huésped. El DNA administrado suele permanecer en el núcleo como un episoma. Esta propiedad permitiría considerar a estos sistemas de Terapia Génica como si fuesen fármacos convencionales, en el sentido de poder determinar la dosis necesaria en función del efecto deseado.

Los vectores no virales de Terapia Génica se componen de tres elementos (1,2): un gen que codifica la proteína terapéutica, un sistema de expresión basado en DNA plasmídico que controle tanto la función del gen dentro de la célula huésped como la secreción de la proteína terapéutica producida, y un sistema sintético de liberación que controle la

distribución, liberación, reconocimiento e internalización del gen. En resumen, un plásmido y un vehículo adecuado. Aunque lo más sencillo sería inyectar directamente el ácido nucleico (DNA "desnudo") en el órgano de interés, este procedimiento es poco eficaz ya que el DNA se degrada rápidamente por la acción de las nucleasas celulares presentes en el suero sanguíneo. Con esta idea los vectores no virales pueden clasificarse según su especificidad y según la naturaleza de su composición.

Vectores no virales según su especificidad

Vectores no virales inespecíficos

Se denominan vectores no virales inespecíficos a aquellos que no poseen elementos cuya función esté orientada a liberar selectivamente en las células el ácido nucleico que transportan. La forma de interacción de estos vectores con la membrana celular es por tanto, inespecífica. En principio, cualquier tipo de célula es susceptible de ser transfectada por un vector inespecífico, aunque existen diferencias en la eficacia de transfección que depende de factores como la naturaleza del tipo celular o su accesibilidad.

Vectores no virales específicos

Con el objetivo de aumentar la eficacia de transfección y añadir especificidad a la Terapia Génica, se ha combinado e incluso combinado e intercalado la interacción no específica entre la superficie celular y los vectores por un mecanismo específico de internalización celular mediado por receptor, mediante la incorporación de ligandos unidos a los vectores. Esta vehiculización específica se denomina "targeting", término que literalmente significa "dianización" y que puede ser traducido como "direccionamiento".

El concepto de transferencia génica mediada por receptor está basado en los mecanismos de entrada utilizados por los virus y las toxinas, pero también en los empleados en la internalización de macromoléculas, incluyendo nutrientes (por ejemplo, LDL o transferrina) y factores de crecimiento y hormonas (insulina, VEGF, EGF o FGF). Los ligandos o "elementos direccionadores" pueden ser proteínas, péptidos, carbohidratos, vitaminas e incluso anticuerpos que reconocen específicamente un elemento de la superficie celular. Para la selección del elemento direccionador es necesario evaluar previamente la abundancia del receptor en las células diana, la especificidad, la afinidad del ligando y si la interacción del ligando con el receptor de membrana es capaz de activar un proceso de internalización celular.

Vectores no virales según su composición

Según su composición los vectores pueden dividirse en vectores de base lipídica, de base polimérica o de composición mixta.

Vectores de base lipídica

Los vectores de base lipídica (liposomas y lipoplejos) se han mostrado particularmente eficaces en la transferencia génica con plásmidos. La interacción electrostática entre el DNA, cargado negativamente y las moléculas cargadas positivamente hacen que se formen unos complejos más o menos estables entre ambos materiales.

Los liposomas (**Figura 1**) son estructuras vesiculares formadas por una o varias bicapas fosfolipídicas, las cuales poseen uno o varios espacios acuosos en su interior.

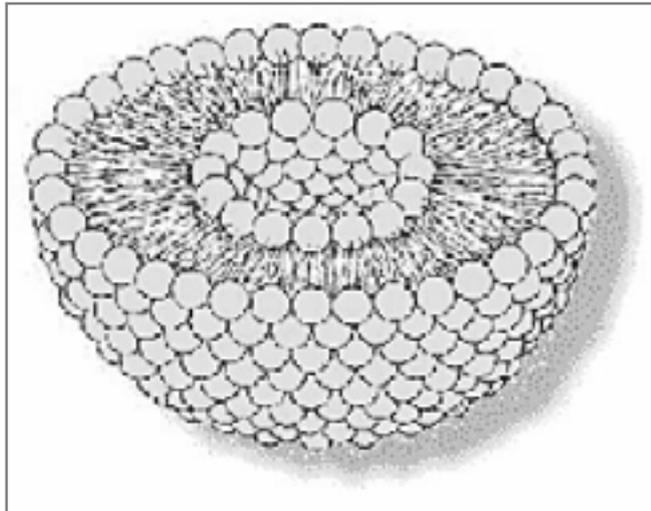


Figura 1. Estructura de un liposoma.

Los liposomas se caracterizan por tener una composición basada en lípidos aniónicos o neutros (3), encontrándose el ácido nucleico encapsulado en los compartimentos acuosos internos de un liposoma esférico, ya sea éste mono o multilamelar. En este caso, la entrada a las células del ácido nucleico se produciría por fusión del liposoma con la membrana celular (liposomas neutros) o por endocitosis del liposoma (liposomas aniónicos) (4).

Los problemas para conseguir rendimientos de encapsulación del ácido nucleico aceptables, junto con la necesidad de separar los liposomas con el DNA encapsulado de las vesículas vacías, ha conducido al desarrollo de vectores basados en lípidos catiónicos, los cuales no presentan estos inconvenientes, por lo que la mayoría de la experimentación en Terapia Génica con vectores lipídicos se fundamenta en formulaciones con lípidos catiónicos. En general para la preparación de liposomas (**Figura 2**) se precisan, al menos, 5 etapas fundamentales: Humidificación, dilatación, agitación para formar vesículas multilamelares, extrusión y homogenización/sonicación.

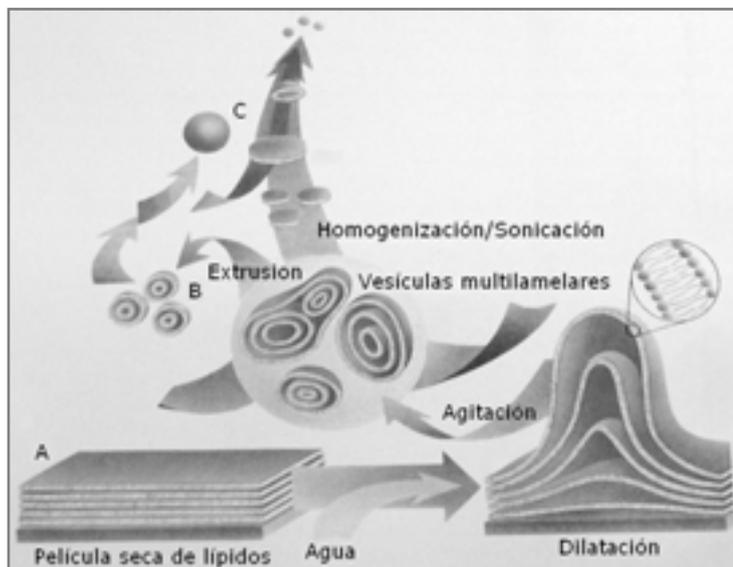


Figura 2. Preparación de liposomas.

La lipofección mediada por liposomas (**Figura 3**) se puede llevar a cabo de forma convencional por la fusión entre membranas lipídicas; mediante interacciones electrostáticas con liposomas catiónicos; de forma dirigida mediante ligandos conjugados que encuentran un receptor específico en la membrana de la célula diana o bien por mecanismos aleatorios. En cualquier caso, el paso del lipocomplejo a través de la membrana celular está mediada

por endosomas y se precisa un transporte activo para que el DNA alcance el núcleo (**Figura 4**).

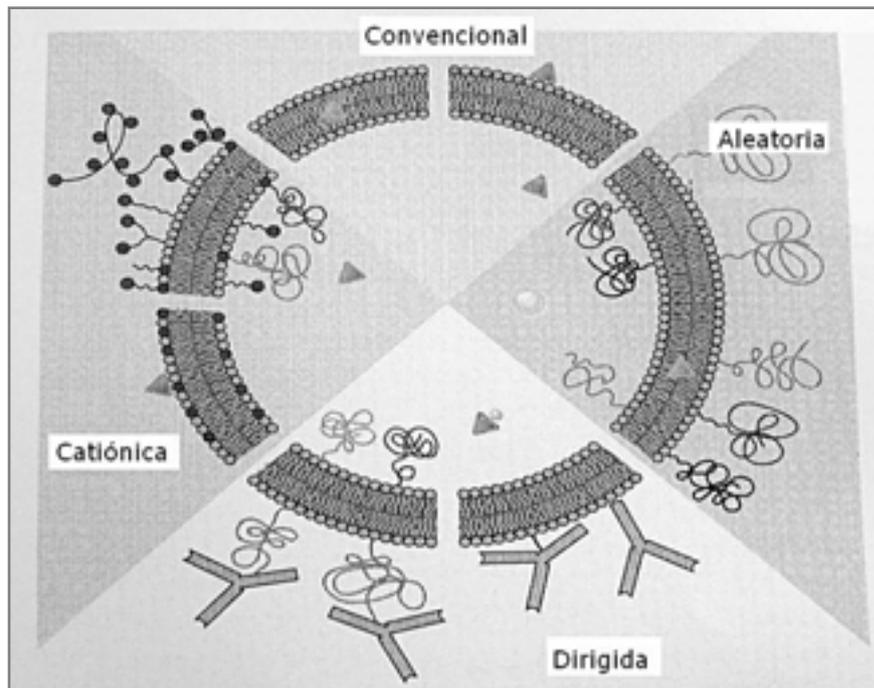


Figura 3. Tipos de lipofección mediada por liposomas.

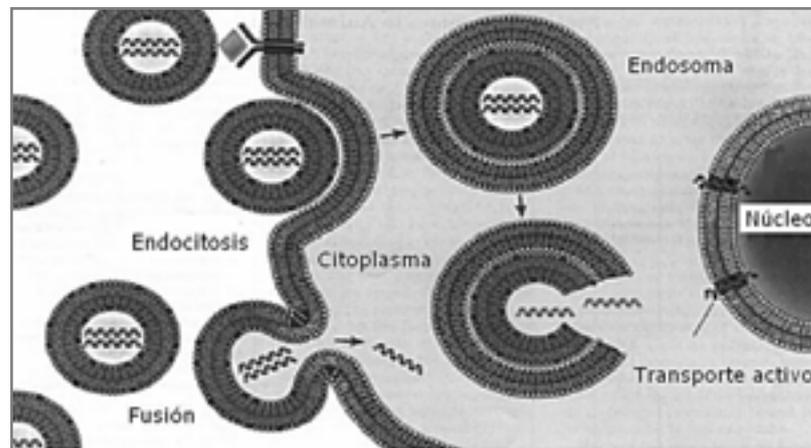


Figura 4. Lipofección con liposomas a través de vía endosómica y transporte activo hacia el núcleo celular.

Se denominan lipoplejos (lipoplexes) a los complejos formados por un ácido nucleico y un lípido catiónico. La interacción electrostática del ácido nucleico con las cabezas polares catiónicas del lípido, tiene como resultado la formación de partículas de formas y tamaños muy variables dependiendo del tipo de lípido utilizado y del método de preparación. La carga positiva del lípido, además de promover la formación espontánea de los complejos, facilita también la interacción del complejo con la membrana plasmática, también cargada negativamente, probablemente a través de la interacción con los proteoglicanos (5).

Los primeros trabajos con lípidos catiónicos se remontan al año 1987, en que se describe la utilización *in vitro* del lípido catiónico sintético, DOTMA (cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi) propil)-N,N,N-trimetilamonio), cuya actividad de transfección era de 5 a 100 veces mayor que la de los agentes no virales utilizados en aquel momento, como el fosfato de calcio y el dextrano (6). Desde entonces, se ha desarrollado una gran variedad de lípidos catiónicos

para la transferencia de ácidos nucleicos. El prototipo de formulación formada por lípidos catiónicos incluye el bromuro de DOTMA junto con la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) o el colesterol.

Desde la introducción en el mercado del reactivo de transfección Lipofectin (compuesto por una mezcla 1:1 (p/p) de DOTMA y DOPE (6), se han desarrollado multitud de formulaciones lipídicas para transfecciones con plásmidos, incluyendo otros lípidos análogos del DOTMA como el 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio) (DOTAP) (**Figura 5**) (7), el bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE) y el trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(espermincarboxamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA). También se utilizan derivados de colesterol, principalmente el 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol) (8).

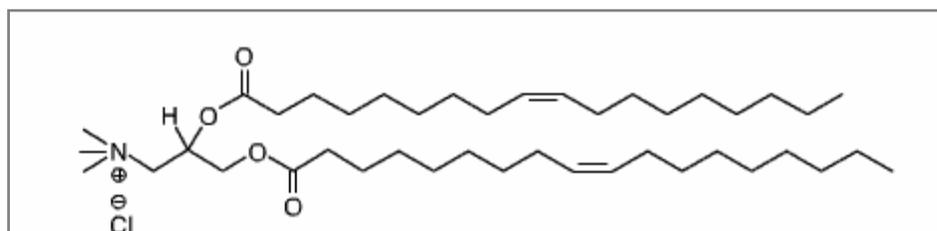


Figura 5. Estructura de DOTAP.

Generalmente, un lípido catiónico consta de una cabeza polar, en la que las cargas positivas las proporcionan uno o varios grupos amina (primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios) y una cola hidrofóbica, que suele estar compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas, que pueden ser saturadas o insaturadas.

Estos complejos han mostrado *in vitro* eficacias de transfección muy altas; incluso se han mostrado eficaces *in vivo* por diversas vías de administración. Uno de los inconvenientes ligado al uso de lípidos catiónicos es su posible toxicidad, que depende de la dosis empleada. A dosis bajas, prácticamente no se observan efectos secundarios, pero a dosis altas pueden producir inflamación aguda. Esta toxicidad se debe a la interacción de sus cargas con la superficie celular (9), aumentada por el hecho de que los lípidos catiónicos pueden no ser metabolizados ni excretados, acumulándose en el organismo. La eficacia de transfección *in vitro* de los lipoplejos supera a la de los sistemas basados en liposomas clásicos, por lo que su uso se ha generalizado con buenos resultados como método de transfección no viral en muchas líneas celulares.

También se han desarrollado diversos modelos de transfección *in vivo* basados en lipoplejos, unos por administración por vía sistémica (10) y otros a través de administración no sistémica (11). Sin embargo, los resultados de la utilización *in vivo* de los lipoplejos no son muy alentadores hasta el momento, ya que su efectividad *in vivo* es muy baja, sobre todo cuando se compara con la de los vectores virales. Parece ser que la escasa eficacia de los lipoplejos *in vivo* es debida a la interacción de éstos con las proteínas del suero (12), que induce su agregación (13) y la activación del sistema del complemento (14), que conduce a la eliminación de los lipoplejos antes de que puedan alcanzar las células diana. Este inconveniente hace que muchas investigaciones se dirijan a mejorar las posibilidades de internalización de los genes terapéuticos mediante el diseño y desarrollo de diferentes sistemas no virales dirigidos al órgano diana de interés.

Los primeros intentos de direccionamiento de vectores de base lipídica se realizaron con composiciones lipídicas clásicas, por un lado buscando evitar la inhibición por el suero de los lipoplejos específicos y por otro dotando al vector de especificidad en la entrega tanto *in vitro* como *in vivo* (15). Referente al direccionamiento *in vitro*, se han utilizado diversos elementos direccionadores, como son los lípidos glicosilados (16), las proteínas tales como

las integrinas (17), la transferrina (18) y los anticuerpos frente a diversos elementos de la membrana.

El direccionamiento *in vivo*, se ha intentado desarrollar, sobre todo, para la administración sistémica, que es el tipo de administración en la que se produce un mayor número de problemas por la inespecificidad de los lipopolisomas. Los elementos direccionadores más frecuentes son glicolípidos (19) o glicoproteínas unidas a los liposomas (20), que son reconocidos por receptores hepáticos. Además, de su papel como elementos direccionadores, los ligandos unidos podrían jugar un papel protector frente a la inhibición del suero.

Vectores de naturaleza polimérica

El complejo formado por el DNA plasmídico con los lípidos catiónicos es ineficaz para la transferencia génica en diversos órganos y tejidos, como es el caso del músculo esquelético. Por esta razón, se han desarrollado sistemas de transferencia génica no virales basados en la acomplejación del DNA con diferentes polímeros. Dentro de este tipo de vectores de naturaleza polimérica están los poliplexos, las micropartículas y las nanopartículas.

El precursor de los actuales polímeros catiónicos fue el DEAE-dextrano, que ya en los años 70 se utilizaba como aditivo en la transferencia de genes con virus, porque en su presencia se incrementaba la infectividad viral. A mediados de los 80 se empezó a utilizar de forma análoga a cómo se hacía con el fosfato de calcio o la polilisina, que es un polímero biodegradable, adecuado para su uso *in vivo*, aunque de manifiesta toxicidad y menor eficacia de transfección que la polietilenimina. Prácticamente todos los trabajos realizados con poliplexos en la década de los 90 se basan en la utilización de la polilisina como reactivo de transfección. Sin embargo, en 1995 aparecen los polímeros catiónicos utilizados actualmente en Terapia Génica, como son la polietilenimina, los dendrímeros, los polimetacrilatos, los péptidos de cadena corta, y entre 1995 y 1997 el quitosano y los péptidos anfifílicos. Actualmente existen polímeros catiónicos que muestran la capacidad de transfectar *in vitro*. Son proteínas, polipéptidos, poliglucoaminas y polímeros sintéticos (21) **(Figura 6)**.

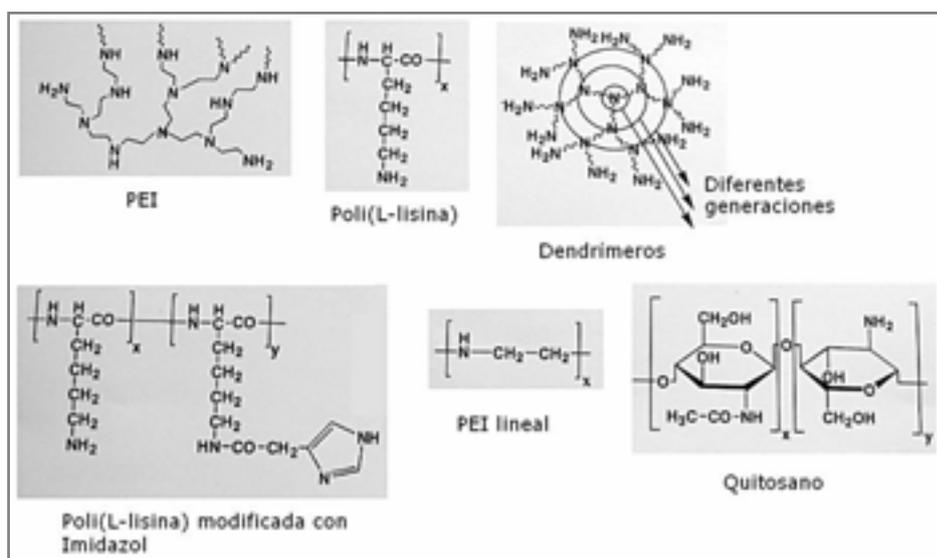


Figura 6. Distintos tipos de polímeros utilizados en la transferencia de genes.

La condensación del DNA plasmídico con polímeros sin carga, como pueden ser la polivinilpirrolidona (PVP) o el polivinilalcohol (PVA) (22) presenta excelentes eficacias de transferencia génica en músculo. Estos polímeros se caracterizan por tener una naturaleza anfipática, con una parte hidrófila que interacciona con el DNA y otra hidrofóbica. Otro tipo

de polímeros sintéticos son los dendrímeros PAMAM (polidoaminoamina), que presentan una estructura denominada "estrella densa" y una serie de monómeros repetidos en torno a un núcleo central; sin embargo solo los PAMAMs de nueva generación han mostrado ser eficaces en la transfección celular (23). Por otra parte, el polímero catiónico poli(2-(dimetilamino)etilmetacrilato) (PDMAEMA), es capaz de condensar el DNA mediante interacciones electrostáticas, formando complejos estables, de baja toxicidad y con altas eficacias de transfección (24). El polímero polialquilcianoacrilato (PACA) es muy utilizado en la encapsulación de oligonucleótidos en nanopartículas (25).

Dentro del grupo de polímeros sintéticos, cabe destacar la polietilenimina (PEI). Se trata de un polímero sintético catiónico de base nitrógeno-carbonada, constituido por unidades repetidas de etilamina que le confieren una alta solubilidad en agua y en la mayoría de los disolventes polares. Uno de cada tres átomos de la molécula corresponde a un grupo amino, que le confiere la capacidad de ser la macromolécula con más alta densidad de potencial catiónico. La PEI tiene la densidad de carga más alta respecto a cualquier polímero orgánico conocido (20-25 miliequivalentes por gramo). Esta carga positiva la adquiere por protonación de los grupos amino. Esto implica que existe una correlación entre el pH y la densidad de carga positiva del PEI. En comparación con la polilisina, la PEI tiene una capacidad tampón a cualquier rango de pH (26). Es un polímero ampliamente utilizado en la industria desde hace 30 años para la purificación de aguas, extracción de minerales, elaboración de champús, etc. Sin embargo, hasta 1995 no sería utilizado como elemento de transfección. Entre las ventajas de la PEI como vector en Terapia Génica se encuentra su fácil asociación con el DNA mediante interacciones electrostáticas, compactando el material genético en pequeñas partículas. Una vez formados los complejos PEI/DNA (poliplejos), la PEI evita la degradación del material genético, ya que lo protege de la acción de las nucleasas y permite proteger al ácido nucleico de la degradación tanto intracelular (sistema de digestión endolisosomal) como extracelular (nucleasas séricas).

Los "poliplejos" de PEI (DNA+polímero) con carga neta positiva interactúan con la superficie celular internalizándose rápidamente. La carga neta positiva de la PEI le dota de la capacidad de unir ligandos cargados negativamente (asialofetúina, transferrina, EGF), que aumentan la especificidad del complejo formulado hacia el órgano diana.

El mecanismo de entrada de la polietilenimina (esponja de protones) puede explicar su elevada eficacia de transfección; una vez dentro de la célula diana, la PEI tampona el endosoma a pH 7,3; dicho cambio de pH estimula a la ATPasa endosomal que provoca una entrada masiva de protones al endosoma seguido de un flujo de iones cloruro. Esta variación en la osmolaridad conduce a la entrada de agua en el endosoma, hinchamiento del mismo y posterior ruptura del endosoma, liberando el DNA al citoplasma, con lo que posteriormente el material genético alcanzará el núcleo celular (27). Esta hipótesis esta basada en la estructura química del polímero, es decir, en el pK_a de los grupos amino.

Existen dos tipos de polietilenimina, la ramificada y la lineal. La forma ramificada se produce por la polimerización de los monómeros de etilenimina por catálisis ácida, dando lugar a polímeros ramificados al azar (28), con una relación de aminas primarias, secundarias y terciarias de 1:2:1. La PEI ramificada adquiere su densidad de carga positiva con la protonación de los grupos de la amina primaria y secundaria. Según su perfil de protonación, solamente cada cinco o seis grupos hay una protonación a pH fisiológico (29). Los grupos amina primarios, además de ser los más básicos, son los más reactivos y susceptibles de modificación química. La unión del DNA a la PEI cambia levemente el perfil de protonación de la PEI, que se traduce en que la mitad o un tercio de los grupos amina se encuentran protonados a pH fisiológico.

Existe polietilenimina ramificada de diferentes pesos moleculares, siendo las más utilizadas las de 25 y 800 kDa. El tamaño y peso molecular del polímero utilizado influyen en la internalización del material genético y en su posterior expresión. Se ha observado que los complejos formados por la asociación de la PEI (800 kDa) con DNA y transferrina son

potentes agentes de transfección *in vivo* e *in vitro* (30), sin embargo esta PEI ramificada de alto peso molecular ha demostrado ser tóxica en ratones cuando se aplica por vía sistémica, en comparación con su análoga de bajo peso molecular —PEI de 25 kDa— que no muestra toxicidad *in vivo*, claro está a costa de una menor eficacia de transfección.

Las formas lineales de PEI se pueden obtener por un proceso similar al de la polietilenoimina ramificada, pero realizado a temperatura más baja o utilizando como monómero de partida un derivado de la 2-oxazolona. En este segundo método, el producto de polimerización es hidrolizado para obtener la PEI lineal (28). La más utilizada en transfección es la de peso molecular de 22 kDa (31), también denominada ExGen 500®, que es un polímero adecuado para transfectar un gran número de tipos celulares con eficacias de transfección elevadas y baja toxicidad *in vivo* e *in vitro* (30).

Los poliplejos (polyplexes) son complejos formados por un ácido nucleico (plásmido u oligonucleótido) y un polímero de carga neta positiva. La formación del complejo se produce por la interacción iónica entre las cargas negativas de los átomos de oxígeno de cada uno de los grupos fosfato del esqueleto desoxirribosa-fosfato del DNA con las cargas positivas del polímero, generalmente proporcionadas por un grupo amino.

Gran parte de la actividad de transfección de los poliplejos depende de sus características físico-químicas. Por esto, se han realizado importantes esfuerzos en esta caracterización, con el objetivo de que estos parámetros puedan ser de utilidad a la hora de predecir y establecer las condiciones de preparación en las que la transfección sea óptima. Las características físico-químicas de los poliplejos como pueden ser su estructura, tamaño, carga o su capacidad de interacción con biomoléculas, dependen en gran parte de la propia naturaleza del polication (estructura, peso molecular, densidad de carga, etc), pero también de propiedades comunes para todos los polímeros como las relaciones de carga o masa entre el polímero y el DNA, y también de las características del solvente utilizado, como la fuerza iónica, para la reacción electrostática.

Al formular los PEI-poliplejos, la condensación completa para la formación de partículas de carga neutra se produce a partir de relaciones N/P de 2 o 3, donde N es el número de átomos de nitrógeno del polímero y P el número de átomos de fosforo del DNA (32). En estas condiciones existe una tendencia a la agregación de las partículas. Las partículas compactas de tamaño menor se obtienen generalmente a relaciones N/P mayores, dando por resultado poliplejos de carga neta positiva.

A las relaciones N/P utilizadas para conseguir una condensación completa ($N/P > 4$), los complejos PEI/DNA tienen un potencial *zeta* en torno a 30-35 mV (33). Respecto a la forma, cuando los complejos son de pequeño tamaño se han encontrado estructuras toroidales que oscilan entre los 40 y los 80 nm por microscopía electrónica y estructuras globulares de hasta 20-40 nm por estimaciones de microscopía de fuerza atómica (34).

Las condiciones de preparación de los poliplejos influyen en el tamaño y estructura del complejo y fundamentalmente en el nivel de agregación. Entre las más determinantes están la concentración de sal y el orden de mezcla (el DNA sobre el polímero o el polímero sobre el DNA). En general, los poliplejos formados en solución salina son de un tamaño mayor que los formados en agua. Otros autores han demostrado la importancia del orden de adición de los reactivos, al observar que la eficacia de transfección *in vitro* era diez veces más alta cuando el polímero se añadía al plásmido (gota a gota) que a la inversa, adicionando el DNA sobre el polímero (27). Posteriormente, se comprobó que estas diferencias estaban asociadas en realidad a diferencias en el tamaño de los complejos preparados de uno u otro modo, lo que depende de la concentración del DNA y del polication, de los volúmenes de las soluciones mezcladas, y finalmente de la velocidad de la mezcla. No parece haber diferencias significativas importantes en el potencial *zeta* entre los poliplejos formados con los distintos tipos de PEI (lineal y ramificada o PEI de alto o bajo peso molecular). En lo que se refiere al tamaño, en condiciones de baja fuerza iónica los complejos formados con los

distintos tipos de PEIs (lineales y ramificadas de diferentes pesos moleculares) parecen ser bastante constantes. Sin embargo, cuando los complejos se preparan en un medio de fuerza iónica más alta aparecen notables diferencias. Mientras que a fuerza iónica fisiológica los complejos formados con PEIs ramificadas (25 u 800 kDa) son pequeños (50-80 nm) o medianos (100 nm a algunos cientos de nm), dependiendo de la concentración de DNA y de la PEI utilizada, los complejos con PEI lineal de 22 kDa forman agregados grandes, cuyo tamaño aumenta a medida que lo hace el tiempo de incubación (35).

Las micropartículas (**Figura 7**) se definen como partículas esféricas de tamaño entre 1 y 1000 μm , compuestas por una o más sustancias poliméricas. Por su parte, las nanopartículas son sistemas coloidales de tamaño inferior a una micra y generalmente de naturaleza polimérica. Para su aplicación como vectores de plásmidos se han elaborado a partir de poliésteres biodegradables, gelatina e incluso a partir de sustancias de naturaleza inorgánica. Hasta el momento los esfuerzos se han centrado en la fabricación y caracterización de las propias nanopartículas, con escasos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*. El principal reto de estos sistemas es conseguir métodos de preparación que no dañen estructuralmente al DNA encapsulado. Esto es importante dado que tamaños tan pequeños sólo se consiguen mediante métodos potencialmente agresivos para el DNA, con tiempos de evaporación largos y formación de emulsiones mediante técnicas muy energéticas.

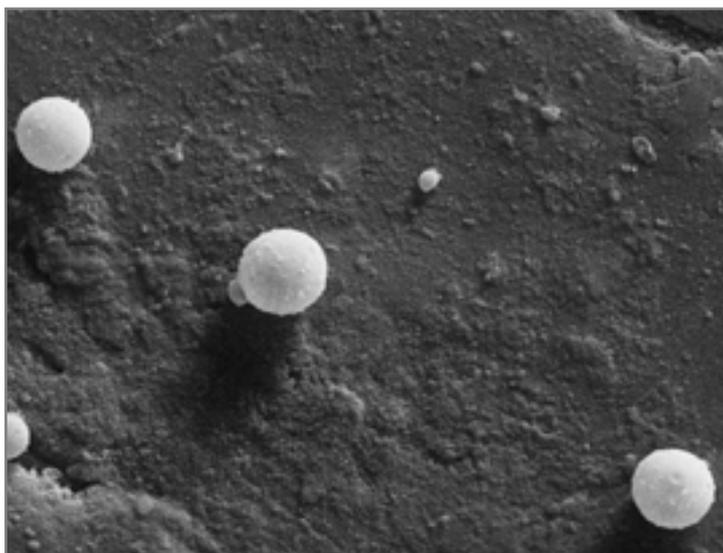


Figura 7. Micropartículas poliméricas.

Vectores de composición mixta

Los vectores de composición mixta, también llamados “híbridos”, son aquellos en cuya formulación se incluyen tanto lípidos como polímeros y reciben el nombre de lipopoliplejos, aunque dependiendo del diseño pueden ser clasificados como poliplejos que incorporan lípidos o como vectores de base lipídica que incorporan polímeros en su composición, según la importancia en mayor o menor medida que desempeñen uno u otro componente en las propiedades del vector.

Los lipopoliplejos son vectores que han demostrado elevadas eficacias de transfección *in vivo* tras su administración sistémica. Surgen de la posibilidad de combinar los poliplejos y los lipoplejos, de manera que conjuntamente aumenten la eficacia de transfección que se obtiene por separado con cada uno de ellos. Sin embargo, este tipo de sistemas híbridos son muy novedosos y existen pocos experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestren, por ahora, sus posibles grandes ventajas.

Un ejemplo práctico: Transferencia génica utilizando políplejos con transferrina

Los lípidos catiónicos se vienen utilizando cada vez más como vehículos de transferencia génica no viral tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de sus limitaciones *in vivo* es que la liberación génica se inhibe por el suero. Se ha demostrado (7) que la eficacia de transferencia génica se incrementa significativamente cuando se conjugan a transferrina (Tf), incluso a altas concentraciones de suero fetal bovino (>60%). El estudio (**Figura 8**) llevado a cabo con DOTAP/DOPE/pCMVLacZ demostró un incremento de hasta 3 veces en la lipofección con el gen de la beta galactosidasa/mg de proteína con respecto al lipoplejo aislado, siempre en presencia de suero. La lipofección en presencia de Tf libre que competía por su receptor y el lipoplejo-Tf disminuía claramente la eficacia de transferencia génica.

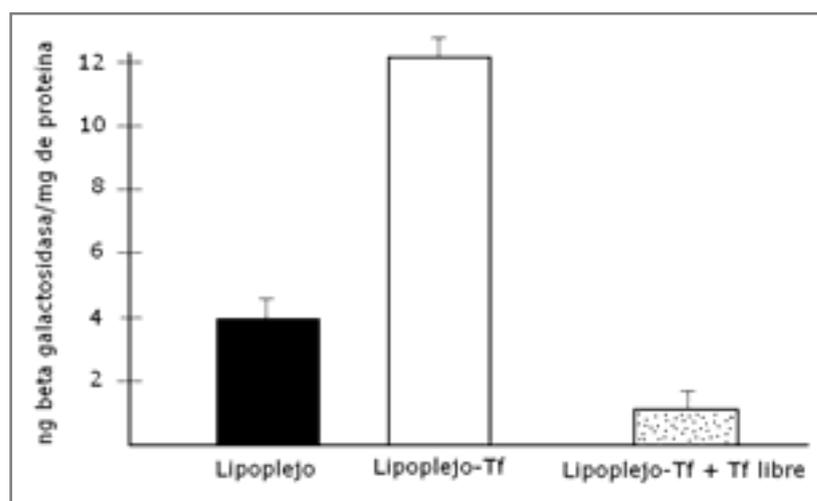


Figura 8. Lipofección utilizando lipoplejos conjugados con transferrina (Tf).

Referencias

1. Mahato RI, Smith LC, Rolland A (1999) Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. *Advances in Genetics* 41: 95-156.
2. Rolland A, Tomlinson E (1996) Controllable Gene Therapy using nonviral system. *In: Artificial self-assembling systems for gene delivery*. Ed. AC. Society. Whashington (USA).
3. Wong TK, Nicolau C (1980) Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene* 10: 87-94.
4. Lee H, Jeong JH (2002) PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J Control Release* 79: 283-91.
5. Wiethoff CM, Smith JG (2001) The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 35: 32806-13.
6. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7413-7.
7. Tros de Ilarduya C, Düzgünes N (2000) Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. *Biochim Biophys Acta* 1463: 333-42.
8. Arshady R (1999) *Microspheres, Microcapsules et Liposomes*. Ed. R. Arshady. Citus Books. London (UK).
9. Loisel S, Le Gall C, Ferec C, Floch V (2001) Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration of lipoplexes. *Hum Gene Ther*, 12: 685-96.
10. Aliño SF (1997) Long-term expression of the human alpha1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector. *Biochem Pharmacol*, 1: 9-13.
11. Porteous DJ, Dorin JR (1997) Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther*, 3: 210-8.
12. Li S, Tseng WC (1999) Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther*, 6: 585-94.
13. Wu J, Lizarzaburu ME (2001) Cationic lipid polymerization as a novel approach for constructing new DNA delivery agents. *Bioconjug Chem*, 12: 251-7.
14. Plank C, Mechtler K (1996) Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*, 12: 1437-46.

15. Simoes S, Slepishkin V (1999) Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene Ther*, 11: 1798-807.
16. Kawakami S, Fumoto S (2000) *In vivo* gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. *Pharm Res*, 17: 306-13.
17. Hart SL, Arancibia-Carcamo CV, Wolfert MA, Mailhos C, O'Reilly NJ, Ali RR, Coutelle C, George AJ, Harbottle RP, Knight AM, Larkin DF, Levinsky RJ, Seymour LW, Thrasher AJ, Kinnon C (1998) Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector. *Hum Gene Ther*, 4: 575-85.
18. Tros de Ilarduya C, Arangoa MA, Moreno-Aliaga MJ, Düzgüneş N (2002) Enhanced gene delivery *in vitro* and *in vivo* by improved transferrin-lipoplexes. *Biochim Biophys Acta* 1561: 209-21.
19. Das PK, Murray GJ, Zirzow GC, Brady RO, Barranger JA (1985) Lectin-specific targeting of beta-glucocerebrosidase to different liver cells via glycosylated liposomes. *Biochem Med*, 1: 124-31.
20. Kawakami S, Yamashita F (1998) Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1: 78-83.
21. Merdan T, Kopecek J, Kissel T (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 715-58.
22. Mumper RJ, Wang J, Klakamp SL, Nitta H, Anwer K, Tagliaferri F, Rolland AP (1998) Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J Control Release* 52: 191-203.
23. Radu DR, Lai CY, Jeftinija K, Rowe EW, Jeftinija S, Lin VS (2004) A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J Am Chem Soc*, 41: 1316-7.
24. Pantoustier N, Moins S, Wautier M, Degee P, Dubois P (2003) Solvent-free synthesis and purification of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] by atom transfer radical polymerization. *Chem Commun*, 3: 340-1.
25. Lambert G, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Couvreur P (2001) Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core for the delivery of oligonucleotides. *Int J Pharmaceutics* 214: 13-6.
26. Tang MX, Szoka FC (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*, 8: 823-32.
27. Boussif O, Zanta MA, Behr JP (1996) Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther*, 12: 1074-80.
28. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9: 5177-81.
29. Suh J, Wirtz D, Hanes J (2004) Real-time intracellular transport of gene nanocarriers studied by multiple particle tracking. *Biotechnol Prog*, 20: 598-602.
30. Ogris, M., Steinlein, P., Carotta, S., Brunner, S., Wagner, E.: DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*. 2001, **3**:E 21.
31. Gebhart CL, Kabanov AV (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release*, 2: 401-16.
32. Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 4: 595-605.
33. Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W, Wagner E (1999) Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery *in vivo*. *J Gene Med*, 2: 111-20.
34. Dunlap D, Maggi A (1997) Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res*, 25: 3095-4101.
35. Kircheis R, Wightman L, Wagner E (2001) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Ad Drug Deliv Rev*, 3: 341-58.

CAPÍTULO 4

La intersección Terapia Génica/Terapia Celular. Nuevas perspectivas, nuevas problemáticas

Antonio Bernad

El objetivo de la Terapia Génica (TG), sola o en combinación con la Terapia Celular (TC), es actuar sobre un ser humano afectado por una condición patológica para obtener un beneficio clínico; en la situación ideal se pretende obtener la curación del enfermo, hecho todavía lejos de ser una realidad para la gran mayoría de las situaciones.

La TG es una nueva estrategia terapéutica que comenzó a desarrollarse hace unos 25 años, y sólo en los últimos tiempos ha sido capaz de ofrecer los primeros resultados positivos. Esta situación es consecuencia de la realidad objetiva, tanto técnica como de conocimiento básico del funcionamiento del organismo. Quizás en sus orígenes se fue excesivamente optimista y se pensó que en poco tiempo esta tecnología podría ofrecer soluciones a un gran número de enfermedades; del mismo modo se comenzaron a realizar un gran número de ensayos clínicos sin demasiada base experimental. La consecuencia fue que la gran mayoría de los intentos concluyeron con rotundos fracasos, unidos a desenlaces puntuales desafortunados de tal forma, que la sociedad perdió rápidamente la confianza en estas tecnologías. En la actualidad, la situación se está reconduciendo en base a lo que se ha aprendido en estas dos últimas décadas, asumiendo que por una parte los resultados obtenidos en modelos experimentales, como el ratón, son muy distantes a la realidad del ser humano, y por otra, que todavía desconocemos una gran inmensidad de mecanismos que regulan la biología de una célula humana. Baste como ejemplo, cómo tras la secuenciación completa del genoma humano, se han descubierto un buen número de secuencias transcritas pero no codificantes —el número en humanos es variable pero se encuentra en el rango de 250-400; aproximadamente un 0,02% del total del genoma humano—, que parecen elementos reguladores post-transcripcionales muy importantes, y que se desconocían completamente en los orígenes de la TG. Esta realidad hace que, actualmente, contemplemos las posibilidades reales de aplicación de estas nuevas alternativas terapéuticas con optimismo pero con una mayor dosis de realismo y cautela, ya que somos conscientes de que estamos muy limitados tecnológicamente y que desconocemos muchos de los circuitos génicos que regulan o pueden influir sobre el resultado final de la intervención terapéutica (**Figura 1**).

En todo caso, está claro que existen tres aplicaciones clínicas reales, que pueden ser consideradas como los auténticos antecedentes de la Medicina Regenerativa. Por un lado el desarrollo del trasplante de médula ósea, que ha sido la verdadera escuela del desarrollo de todos los conceptos básicos de la definición, aislamiento y aplicación de las células madre; de otro, la reparación de lesiones de cartílago hialino mediante la reimplantación de condrocitos autólogos expandidos *ex vivo* y, en tercer lugar, el tratamiento de quemados extensos mediante la implantación de equivalentes epidérmicos obtenidos también mediante cultivos *ex vivo*.

Las células madre

El concepto de célula madre (**Figura 2**) en el individuo adulto arranca de los trabajos pioneros que permitieron desarrollar el trasplante de médula ósea y que tantas vidas ha salvado. La médula ósea es el órgano donde se producen las células sanguíneas a partir de distintos “progenitores” mediante una organización piramidal que, tras ejecutar un complejo programa de desarrollo, originan los cientos de millones de células funcionales que necesita el organismo diariamente en su sangre y órganos linfoides secundarios (donde madura la respuesta inmune). El funcionamiento *de por vida* de éste dinámico sistema

—linfohematopoyético— está garantizado si se consigue mantener un pequeño número de células madre (0,01-0,1% de la celularidad de la médula ósea) alojadas en lo más íntimo del hueso del individuo. Si se consiguen extraer y trasplantar un número suficiente de estas células madre hematopoyéticas (CMH), conseguiremos que el organismo receptor pueda reconstituir y mantener su sistema linfohematopoyético totalmente funcional durante el resto de la vida.

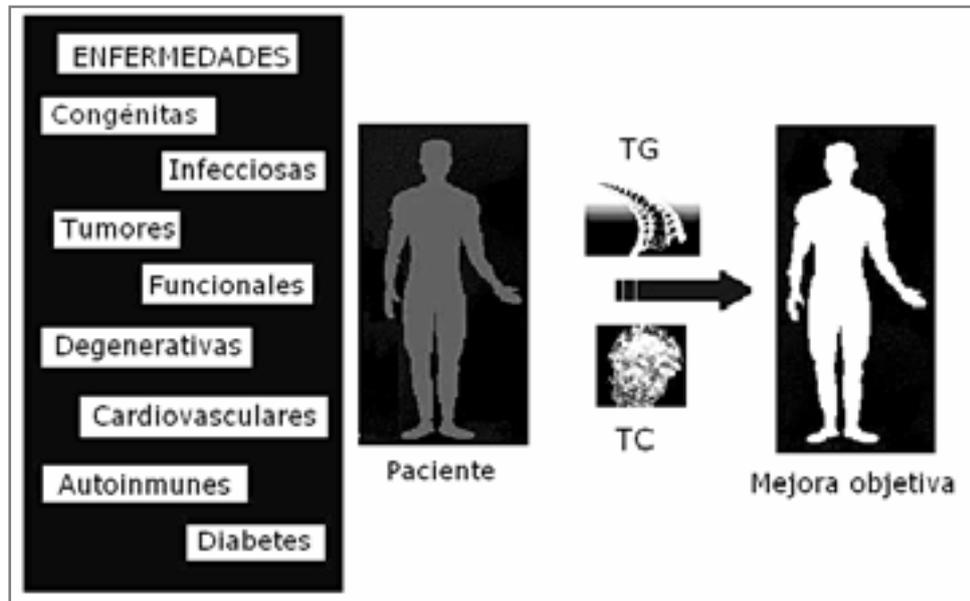


Figura 1. Conjunción Terapia Génica/Terapia Celular en el tratamiento de las patologías humanas.

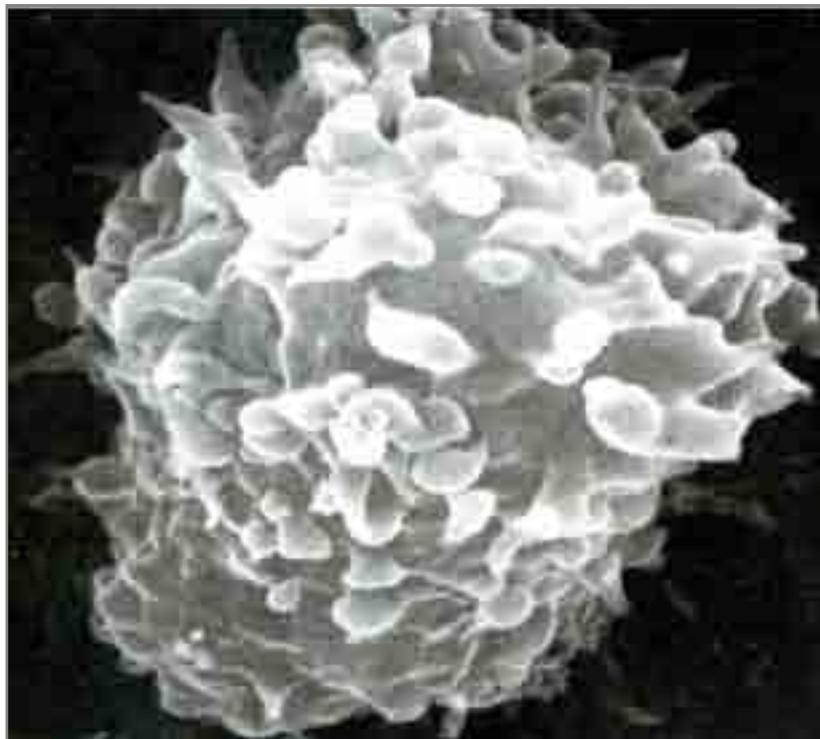


Figura 2. Microfotografía de una célula madre.

En el organismo adulto la inmensa mayoría de sus células se encuentran en un estado, que denominamos “postmitótico”, en el que raramente se dividen y multiplican. Están ejerciendo las funciones para las que han sido programadas y sólo en casos excepcionales (daños de

diversa índole) salen de su letargo y, en la medida que les permita su entorno y su propio potencial, repararán el daño producido. A esta regla general sólo escapan cuatro órganos que se encuentran en una situación de alta actividad fisiológica: a) La médula ósea, por la exigente demanda de células sanguíneas y mediadoras de la respuesta inmune; b) Las gónadas, que generan constantemente células germinales; c) El hígado, que tiene una gran capacidad de regeneración, y e) Los epitelios, sobre todo el intestinal y el epidérmico, que están en una continua renovación. En los cuatro órganos existen poblaciones con características de células madre, específicas de tejido, que dan justificación a dicho potencial. En los últimos años, el panorama respecto a otros órganos como el cerebro, el músculo esquelético o el corazón ha cambiado significativamente; todos estos órganos parecen también contener una población de células madre que son capaces de contribuir a mantener la funcionalidad de los órganos dentro de unos márgenes fisiológicos.

De manera transitoria, en el momento del parto, una gran proporción de células hematopoyéticas se encuentran en la sangre contenida en el cordón umbilical y en la placenta. Si se recoge adecuadamente la sangre placentaria en el momento del parto se puede obtener una población muy sustancial de células madre hematopoyéticas, con la que se han establecido los denominados Bancos de Sangre de Cordón. Esta fuente es ideal para el trasplante en niños o adultos de bajo peso con enfermedades hematológicas severas.

Una célula, cuando se divide, genera normalmente dos células equivalentes a la anterior (división simétrica), y así sucesivamente. Posteriormente, las células descendientes pueden evolucionar por distintas vías (programas de diferenciación), para generar tipos celulares con funciones muy dispares, o mantener su potencial inicial. Si éste mecanismo de división actuase sobre todas las células con un alto potencial de multiplicación (proliferación), pondría en alto riesgo al organismo ya que podría fácilmente generar un descontrol en el número de células adecuado y dar lugar a un foco neoplásico (tumor). Por el contrario, las células madre parece que están reguladas por un mecanismo de división conservador (asimétrico), de forma que de su división se genera una célula equivalente a la original y otra que da cuenta del resto del programa de diferenciación. Este mecanismo se denomina de "automantenimiento" ya que controla, de forma estricta, el número de células madre que existe en un determinado órgano. Aunque éste mecanismo no ha sido demostrado formalmente en mamíferos, en base a mecanismos deducidos de otros organismos modelo (la mosca del vinagre, *D. Melanogaster*, y una planta, *A. Thaliana*, *pe.*), se acepta como adecuado en este contexto.

Además, al menos en el organismo adulto, no todas las células madre de un órgano participan activamente en el proceso de regeneración y mantenimiento de la funcionalidad. Sólo unas pocas están contribuyendo de forma simultánea en un momento dado. La mayoría se encuentra en estado de reposo —conocido como quiescencia—, lo que las protege tanto de agresiones externas, físicas o químicas, como del proceso de envejecimiento celular. Cuando las células madre que están contribuyendo agotan su potencial y desaparecen, son sustituidas paulatinamente por la progenie de otras nuevas que se activan. Este fenómeno se denomina "sucesión clonal".

En definitiva, una célula madre se define, funcionalmente, cómo una célula capaz de "automantenerse" (mediante el mecanismo de división asimétrica) y con potencial de generar (mediante diferenciación de sus células descendientes) varios linajes celulares (pluripotencia) o todo el organismo (totipotencia). Además, una célula madre en su entorno natural posee una tendencia manifiesta a encontrarse en situación de quiescencia.

Todo este campo ha sufrido un gran cambio conceptual en los últimos años; así en el año 2000 el número de funciones génicas implicadas en el control de los procesos de automantenimiento, o del equilibrio proliferación/diferenciación conocidas eran muy pocas. En primer lugar, el nuevo siglo nos ha demostrado que el concepto "clásico" de célula madre en el organismo adulto hay que revisarlo. Lo más importante, es la ruptura de un dogma que implicaba que estas células madre sólo podrían contribuir a la regeneración del linaje,

tejido u órgano en el cual están alojados y para lo que han sido programadas. Al refinar los sistemas de análisis, se ha podido comprobar que las células madre obtenidas de médula ósea adulta, pueden ser utilizadas para la reparación de daños inducidos en corazón, músculo, cerebro, hígado, epitelios y vasos sanguíneos. De igual manera, se ha demostrado que líneas celulares madre derivadas del sistema nervioso central y células madre de músculo (células satélite) pueden contribuir a la regeneración del sistema linfohematopoyético. Estas contundentes evidencias inauguran un nuevo concepto que se viene denominando como “plasticidad” de la célula madre y que se concreta en el hecho de que una célula madre (en genérico) posee la capacidad intrínseca de ejecutar una gran variedad de programas genéticos de desarrollo, y las decisiones sobre cuál llevar a cabo vienen determinadas por el entorno del tejido en el que se encuentran (factores secretados, contactos con otros elementos celulares que las regulan, etc). Por el momento, lo que tenemos en las manos son las primeras evidencias científicas de que estos procesos pueden ocurrir o que se pueden inducir. Estamos todavía lejos de una posible aplicación clínica real, fundamentalmente porque la cantidad de células madre que se puede obtener de un individuo adulto es escasísima y no hemos aprendido todavía a expandir su número de una forma adecuada.

El potencial terapéutico de las células madre es enorme. Basta pensar en la cantidad de personas que todavía mueren a la espera de un transplante de un órgano vital, a sabiendas que de conseguir un donante adecuado, esto les ofrecería unos cuantos años con una mayor calidad de vida. En otros casos, algunos órganos del paciente sufren daños debidos a procesos traumáticos, patológicos o causados por hábitos insanos, que solamente pueden ser aliviados mediante complejos procedimientos clínico-quirúrgicos. La tecnología asociada a la manipulación de células madre empieza a ofrecer un futuro en todos estos campos.

Sin embargo, el mayor problema actual al que se enfrenta el biotecnólogo, el ingeniero genético o celular, o el clínico, que pretenden utilizar células madre con fines terapéuticos, es que, en la mayoría de los casos (hay notables excepciones), estas células madre una vez extraídas de su entorno natural tienen una gran tendencia a “diferenciar” perdiendo, total o parcialmente, su “toti- o pluripotencia”. Este problema parece estar relacionado con el nivel de conocimiento de su regulación. En el momento que obtengamos la información adecuada, se podrán mantener *ex vivo* en unas mejores condiciones que permitan preservar su potencial, aspirando incluso a expandir su número para llegar a situaciones óptimas de aplicación clínica. Otro de los problemas es el control de las consecuencias que la expansión *ex vivo* puede tener sobre la salud genética de la célula madre; cada vez queda más claro que las condiciones de cultivo ejercen cierto grado de estrés a las células que puede redundar en la fijación de ciertos cambios genéticos que pueden afectar a su potencialidad o bioseguridad (1).

La intersección Terapia Génica/Terapia Celular

Si el procedimiento terapéutico implica la modificación genética de la población diana, a todos estos condicionantes comentados hay que añadir otros específicos. En primer lugar, hay que seleccionar el método más apropiado para la aplicación que perseguimos. Teóricamente, lo ideal sería “sustituir” la región del genoma que contiene la alteración patológica por una versión correcta de la misma; esto sólo se puede conseguir mediante un procedimiento que se denomina “recombinación homóloga” y que en células de mamífero, debido a su baja eficacia, está descartado como procedimiento de utilidad práctica. La gran mayoría de los intentos realizados se basan en la denominada “terapia de adición”, procedimiento que intenta —aunque la versión patológica del gen siga presente en la célula— la introducción de una o más versiones capaces de expresar la proteína afectada y así inducir un beneficio objetivable. Obviamente, en esta aproximación, la regulación del gen artificial, normalmente, será muy distinta a la versión autóloga y estará muy restringida a los elementos de regulación de la expresión génica que se han aislado y caracterizado. En todo caso, es lógico pensar que si tratamos una enfermedad en la que el gen afectado está

muy modulado por distintas condiciones fisiológicas, esta situación es prácticamente imposible de reproducir por las construcciones artificiales, y no serán éstas las patologías de elección. Aquellas condiciones patológicas en las que el gen afectado no sea modulable y actúe como "housekeeping" serán más apropiadas.

Del mismo modo, es importante ser consciente de que cualquier sistema fisiológico basado en células madre se encuentra estructurado de forma similar a lo establecido en el sistema linfohematopoyético, y que cualquier manipulación genética inducida en los compartimentos de células maduras o progenitores comprometidos, será suplantada por las subsiguientes oleadas que provienen del compartimento de células madre. Dicho de otra manera, sólo es posible conseguir una modificación permanente si conseguimos incluir la modificación genética deseada en un porcentaje significativo del compartimento de células madre. Otro efecto interesante, al parecer crítico en los escasos ejemplos que han demostrado una mejora objetiva en los pacientes tratados, es la posibilidad de que se produzca una selección positiva *in vivo*. Este efecto está basado en algunas observaciones que han demostrado que algunos pacientes afectados por enfermedades monogénicas han presentado una clara mejoría espontánea basada en la reversión de la mutación que causaba la enfermedad en una o un número muy escaso de células madre. Este hecho lo que demuestra es que si las células "tratadas" pueden manifestar una mejora de sus cualidades biológicas, éstas pueden competir con las células afectadas por la enfermedad y colonizar lentamente el órgano afectado. La consecuencia es que aquellas enfermedades en las que pueda existir la posibilidad de que éste efecto se produzca, son mejores candidatas para ser tratadas mediante TG/TC, dado que somos conscientes de que no podemos reemplazar todo el compartimento de células madre de forma adecuada.

En este entorno cualquier procedimiento de TG/TC que se planee debe optimizar las siguientes fases: a) Obtención de una población de células diana adecuada; b) Establecer unas condiciones de cultivo *ex vivo* que permitan su expansión hasta obtener un número adecuado de células para posibilitar una intervención; c) Contar, cuando sea necesario, con un procedimiento de modificación/selección genética eficaz y d) Lograr una prediferenciación de las células manipuladas para favorecer su posterior reimplantación en el paciente (**Figura 3**).

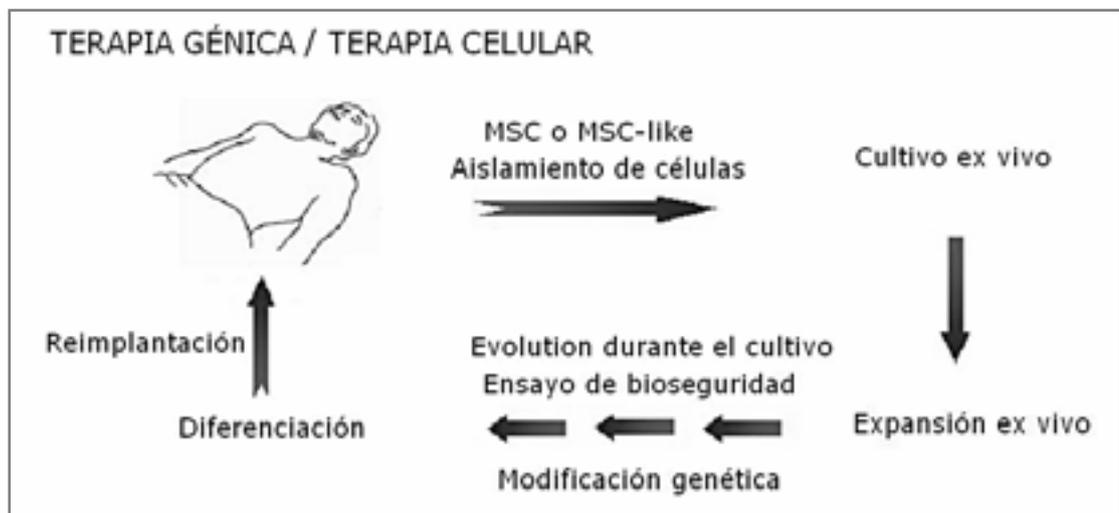


Figura 3. Protocolo general de Terapia Génica/Terapia Celular (MSC, células madre mesenquimales).

Un ejemplo: Aproximación al tratamiento de la Hemofilia B mediante Terapia Génica cutánea

El grupo de Bernad ha intentado durante los últimos años establecer un procedimiento preclínico para el tratamiento de la Hemofilia B mediante la manipulación de equivalentes

dermoepidérmicos, capacitándolos para secretar al torrente sanguíneo la proteína deficitaria, Factor IX (FIX). Este trabajo, realizado en colaboración con el grupo de epitelios del CIEMAT, dirigido por el Dr. Jorcano, está basado en trabajos previos de ambos grupos que aúnan la experiencia adecuada en la manipulación de epitelios y la optimización de vectores retro y lentivirales. En una colaboración anterior, se consiguió demostrar que esta aproximación era factible para conseguir secretar cantidades terapéuticas de la hormona leptina en un modelo genéticamente deficiente (2).

La primera fase de investigación se dirigió a la construcción y validación de los vectores virales que se habían diseñado; se clonó el cDNA de FIX tanto en vectores retrovirales (basados en el virus de la leucemia murina, Mo-MLV) como lentivirales (derivados del virus de la inmunodeficiencia humana, HIV-1) bicistrónicos, que utilizaban la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador seleccionable, y se comparó su capacidad de expresar y secretar FIX en queratinocitos primarios humanos. Los resultados fueron claros, y demostraron que los vectores lentivirales eran netamente superiores (más de seis veces) a los retrovirales. Posteriormente, se abordó mejorar el nivel obtenido de expresión utilizando otros promotores descritos como más adecuados para ser empleados en epitelios en base a dos alternativas diferentes, bien con el promotor del factor de elongación 1a (EF1 α) o la incorporación de 700 pares de bases, que habían sido descritas como esenciales para controlar la especificidad de algunos promotores de keratinas, al promotor del CMV (700CMV). En ambos casos los resultados sobre queratinocitos primarios humanos fueron más pobres que los obtenidos con anterioridad. Sin embargo, sorprendentemente, cuando se valoraban en paralelo los tres tipos de vectores sobre una situación que es más pareja a la realidad, como son los cultivos organotípicos, se pudo confirmar que la estructura 700CMV era la más eficaz para promover la secreción de FIX hacia la cámara inferior del cultivo. Esto podría querer decir que en situaciones fisiológicas la estructura promotor/regulador 700CMV podría ser la más adecuada para conseguir la secreción al torrente sanguíneo, remarcando a su vez la necesidad de utilizar modelos lo más cercanos posibles a la situación fisiológica para valorar la eficacia de las distintas construcciones.

Finalmente, se ha estudiado el transplante de los equivalentes dermoepidérmicos manipulados para conseguir la secreción del FIX, en ratones inmunodeficientes. En un número significativo de animales se pudo comprobar la estabilidad y estructura de los injertos, valorados mediante análisis de la expresión de GFP y estudios inmunohistológicos. En dos animales (R2 y R1) se pudo comprobar una expresión estable de FIX humano en plasma después de 90 y 150 días desde el transplante, respectivamente. Los niveles fueron variables, pero se encontraban en el rango de 1-20 ng/mL, límite inferior de utilidad clínica.

Por último, sobre la hipótesis de que quizás la secreción de FIX al torrente sanguíneo pudiese estar mediada por la interacción con colágeno IV, que pudiese secuestrar una cantidad significativa del FIX producido en el compartimento epitelial, se valoró la posibilidad de utilizar mutantes (K5A, V10K), previamente descritos, que tienen disminuida esta capacidad de interacción con colágeno IV. Los experimentos preliminares indican que dichas proteínas mutadas son expresables y estables en el compartimento epitelial, y que probablemente rindan valores más altos de FIX circulante. La última fase de investigación consistirá en la utilización de las mejores construcciones y células madre epiteliales humanas en modelos de ratón inmunodeficientes y hemofílicos.

Las células mesenquimales humanas, una población diana de gran potencial de diferenciación

A este amplio escenario de la Medicina Regenerativa se han añadido en los últimos años nuevos actores, como es el caso de las células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*). Estas células se aislaron y caracterizaron originalmente en la médula ósea y parecían ser las responsables de la creación del microambiente (se conoce como estroma) que es necesario para regular y controlar la funcionalidad de la médula ósea. Estudios posteriores,

que se iniciaron en el año 1992, han demostrado que las células madre mesenquimales se pueden mantener, expandir y manipular *ex vivo*, siendo capaces de diferenciar a numerosos tipos celulares incluyendo adipocitos (tejido adiposo), mioblastos (tejido muscular), osteoblastos (tejido óseo) y condriocitos (tejido conectivo o de soporte), entre otros (3,4,5,6).

Por tanto, esta población de células mesenquimales, abría una nueva frontera en el desarrollo de futuras estrategias para la ingeniería de tejidos (7). Lo único que podía limitar su aplicabilidad era su escasa representación (1 de cada 10^5 células del estroma de médula ósea es una célula madre mesenquimal).

Nuevos datos indican que esta limitación se puede superar ya que en un sorprendente y a la vez revolucionario hallazgo, el grupo liderado por el Dr. Hedrick, de la Universidad de Los Angeles-California (UCLA), demostró que el tejido adiposo es una fuente muy rica en células madre mesenquimales (8). A partir de muestras de tejido adiposo obtenidas en procedimientos de liposucción, se han obtenido grandes cantidades de poblaciones celulares que cumplen el principal requisito exigido a las células madre mesenquimales. Formalmente no hay evidencia concluyente de que en esas poblaciones existan auténticas células madre, ya que el resultado de diferenciación multilínea puede atender a varios mecanismos. Sin embargo, éste resultado ha abierto una importantísima puerta a la obtención de células madre para su uso en trasplante o ingeniería de tejido autólogo (del propio paciente), ya que la fuente de dichas células es un tejido muy accesible y la intervención es muy poco invasiva, a la vez que está perfectamente estandarizada. Un nuevo horizonte se abre ante la futura terapéutica de muchas enfermedades humanas.

El grupo de Bernad se inicia en la utilización de las células madre mesenquimales en colaboración con el prestigioso grupo de traumatología de la clínica CEMTRO de Madrid, dirigido por el Dr. Guillén. El objetivo principal del trabajo estaba centrado en la puesta a punto de las técnicas de cultivo y control de condriocitos humanos desdiferenciados para uso en trasplantes humanos. En paralelo con éste trabajo, se realizó una caracterización exhaustiva de éste tipo celular, tanto en su forma primaria como en su evolución en cultivo. Los resultados fueron sorprendentes ya que todo apuntaba a que los condriocitos articulares desdiferenciados eran una población celular muy similar tanto a las células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, como a las derivadas de tejido adiposo. Las analogías se referían a proteínas de superficie, a nivel del proteoma celular y en cuanto al potencial de diferenciación. En consecuencia, se concluía que los condriocitos articulares desdiferenciados eran un subtipo de célula madre de cartílago, que si se extraía de su nicho específico era capaz de manifestar un potencial mucho mayor del esperado.

Posteriormente, se ha continuado en esta línea en un ensayo clínico que intenta utilizar células madre mesenquimales autólogas, obtenidas de tejido adiposo, para fomentar el potencial de cicatrización espontáneo en el contexto del tratamiento de fístulas. Este ensayo clínico, ha sido liderado por el Dr. García-Olmo del Hospital Universitario "La Paz" de Madrid y la empresa de biotecnología *Genetrix*, como promotor del ensayo. Se ha caracterizado la evolución de las células madre mesenquimales durante su proceso de expansión *ex vivo*. El objetivo fundamental era establecer los márgenes de bioseguridad estrictos que éste tipo de manipulación pudiese imponer. Los resultados indicaban claramente que durante los intervalos habituales de expansión (8-10 semanas), y en las condiciones de cultivo habituales (fase pre-senescente), los cultivos se comportaban adecuadamente, y las células obtenidas eran indistinguibles de las de la muestra inicial. Sin embargo, si se forzaban las condiciones, manteniendo prolongadamente dichos cultivos, comenzaban a observarse alteraciones en la población celular. Por tratarse de poblaciones celulares primarias, en distintos momentos del cultivo, se obtenían signos de senescencia celular; sin embargo, lo que resultaba sorprendente era que todos los cultivos eran capaces de superar esta fase y continuar en cultivo durante 3 o 4 meses más. Esta fase se denomina post-senescente. Finalizada esta fase, todos los cultivos atravesaban una fase de crisis celular de la que la gran mayoría no se recuperaba. Únicamente en una minoría de ellos emergían tipos

celulares diferentes, con gran capacidad de proliferación que permanecían estables de forma indefinida. Experimentos de xenotransplante sobre cepas de ratones inmunodeficientes han permitido concluir que las células recuperadas tanto en la fase pre-senescente como post-senescente (aunque en algunas muestras de estas últimas se observaban alteraciones cromosómicas) no generaban ningún tipo de patologías en los modelos animales. Sin embargo, las células derivadas de las fases finales de cultivo, eran células transformadas y provocaban tumores. A estas células se las denomina TMC (*transformed mesenchymal stem cells*) y son el primer ejemplo de una transformación espontánea de una célula madre adulta (1) (**Figura 4**).

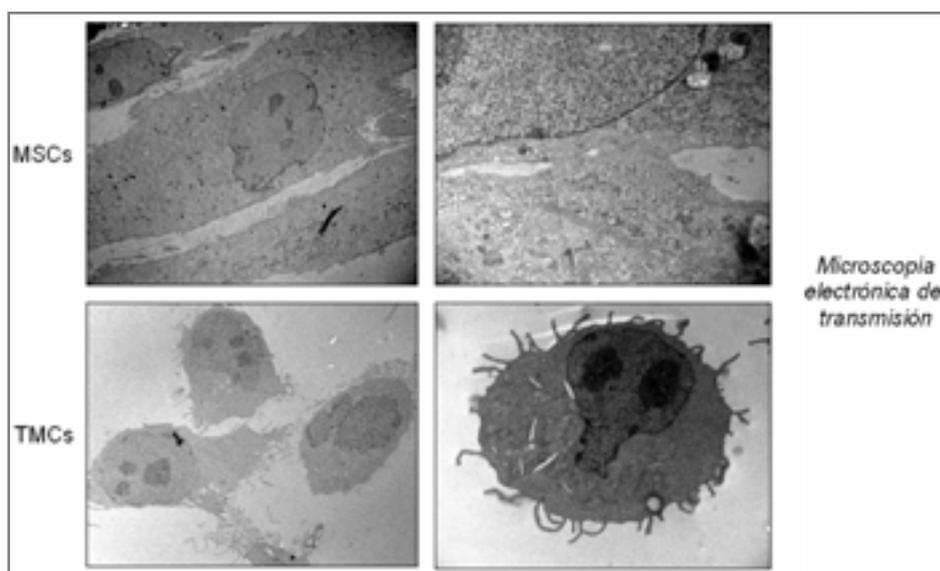


Figura 4. Transformación de células madre mesenquimales (MSC) en TMC (transformed mesenchymal stem cells).

Estos trabajos han demostrado, por primera vez, el potencial de algunos tipos de células madre adultas para sufrir una transformación espontánea, y remarcan dos recomendaciones claras, asociadas a los procedimientos de Terapia Celular: a) La muestra primaria de células humanas no debe ser muy escasa, con el objeto de minimizar el tiempo de expansión *ex vivo* y b) La re-expansión de cualquier muestra de células madre debe ser extremadamente cuidadosa.

Así pues, las células madre mesenquimales, siendo cautelosos, abren nuevas perspectivas en un sentido positivo pero también en otro negativo (**Figura 5**). Porque éstas pueden derivar como es, de forma natural, en funciones fisiológicas normales y de otra abrir nuevas posibilidades terapéuticas pero también —y en esto el futuro y el tiempo lo confirmarán o lo desmentirán— podrán ser objeto de nuevas implicaciones fisiopatológicas por la derivación a células transformadas causantes de tumor que invaliden su utilización tanto en Terapia Génica como en Terapia Celular.

Pero siendo optimistas, hay que seguir alimentando el entusiasmo en paralelo a un gran rigor científico y una extremada cautela. Las expectativas que generó en su día la posibilidad de introducir en un organismo vivo nuevas versiones "correctas" de los genes que contenían mutaciones asociadas a enfermedades genéticas humanas (Terapia Génica) quizás fueron desmedidas. Las causas de esto se podrían buscar en la ambición humana o en la presión social por intentar trasladar a la clínica los resultados de la investigación básica de forma muy precipitada pero, en cualquier caso, ha generado una gran sensación de frustración para investigadores, clínicos y pacientes por los escasísimos beneficios clínicos que se han podido demostrar (9,10). Es de esperar que no ocurra lo mismo con las

infinitas posibilidades que, sobre el papel, la combinación de la Terapia Génica y la Terapia Celular ofrecen.

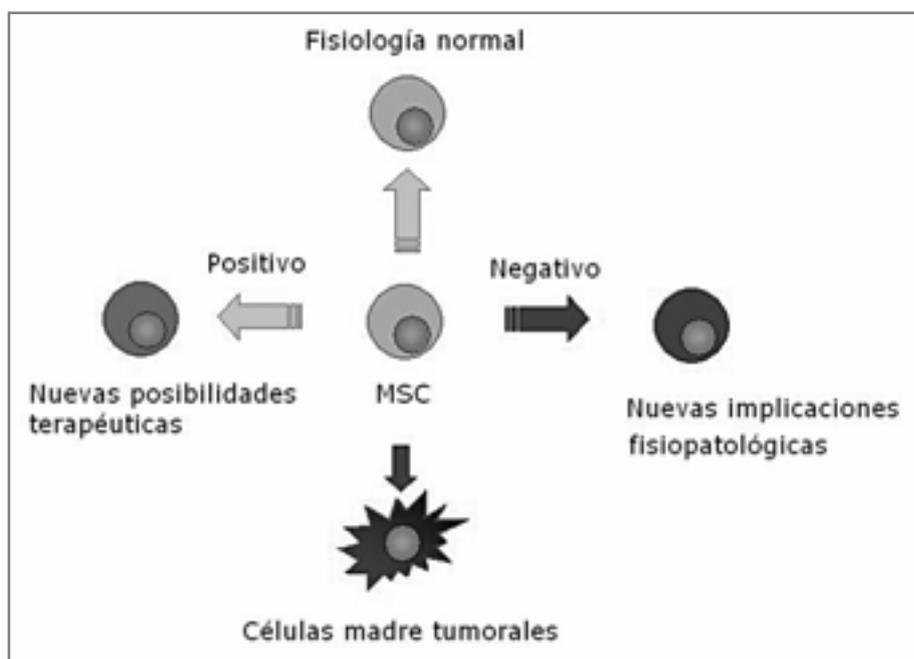


Figura 5. La nueva perspectiva que ofrecen las células madre mesenquimales.

Referencias

1. Rubio D, García-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 65: 3035-59.
2. Larcher F, Del Rio M, Serrano F, Segovia JC, Ramirez A, Meana A, Page A, Abad JL, Gonzalez MA, Bueren J, Bernad A, Jorcano JL (2001) A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts. *FASEB J*, 15: 1529-38.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7.
4. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner MK (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 5: 309-13.
5. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10711-6.
6. Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K (2000) Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 18: 252-60.
7. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 148-52.
8. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211-28.
9. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-72.
10. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*, 24: 257-61.

CAPÍTULO 5

Aplicaciones clínicas de la Terapia Celular

Nuria María de Castro y Elena Sánchez

En la actualidad, la Medicina tradicional no puede ofrecer una solución efectiva para muchas patologías. Por este motivo, se está profundizando en el conocimiento de los mecanismos genéticos y celulares como un importante instrumento para la terapéutica.

La secuenciación del genoma animal —incluido el mapa genético del hombre, cuya estructura comenzó a descifrarse en 1990 gracias al Proyecto Genoma Humano— ha proporcionado a los investigadores una serie de valiosos datos a la hora de comprender la fisiología de las enfermedades genéticas, pudiendo, gracias a esta investigación, asignar el origen de ciertas enfermedades a mutaciones localizadas en uno o varios genes.

Ya en el siglo XVI, hacia 1536, el humanista *Paracelsus* indagó en la posibilidad de que las propias células tuviesen propiedades curativas, sentando así las bases de la Terapia Celular. No obstante, estos cimientos, todavía precarios, no serían desarrollados hasta hace pocos años. En su libro "*Der Grossen Wundartzney*", *Paracelsus* escribía: "*The heart heals the heart, lung heals the lung, spleen heals the spleen; like cures like.*", esto es, "*el corazón cura al corazón, el pulmón cura al pulmón, el bazo cura al bazo; lo semejante cura a lo semejante*". Pero quien se puede considerar, más propiamente, como padre de las actuales técnicas de Terapia Celular es el controvertido catedrático y médico suizo *Paul Niehans* (1882-1971), que ya en 1931, implantó capas celulares de glándula pituitaria de ternera en pacientes humanos con notables resultados. Su método curativo tuvo tal repercusión que el Papa Pío XII fue paciente suyo en 1955. Cinco años después, en 1960, *Peter Brian* y *Frank McFarlane* fueron galardonados con el Premio Nóbel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento de la tolerancia inmunológica en los tejidos trasplantados. La Terapia Celular despegaba como nuevo campo de investigación en la Medicina.

Todas estas aportaciones, añadidas al resto de investigaciones y descubrimientos que hasta hoy se han realizado, nos ofrecen el marco donde situar la relación Terapia Génica-Terapia Celular que se trata en este capítulo.

La Terapia Génica y la Terapia Celular ¿Dos técnicas diferentes?

La Terapia Génica puede ser considerada un método independiente de la Terapia Celular, o bien puede entenderse como una técnica específica dentro de ésta puesto que, al fin y al cabo, en la Terapia Génica lo que se modifica es el genoma de una o de varias células.

La Terapia Génica consiste en vehiculizar secuencias de DNA o RNA al interior de células diana con objeto de modular la expresión de ciertas proteínas que se encuentran alteradas y revertir así el defecto genético. Esta técnica permite modificar el patrimonio genético del paciente mediante la introducción de genes funcionales en base a dos estrategias, la Terapia Génica *in vivo* que introduce en sangre u otros tejidos los vectores portadores de los genes terapéuticos para su actuación en dichos tejidos o en distintos órganos, y la Terapia Génica *ex vivo* que consiste en extraer las células del tejido seleccionado de un paciente, aislarlas, introducir en ellas genes no defectuosos, cultivar las células que los hubieran aceptado y, por último, reimplantarlas en el paciente. Esta estrategia permite la elección del tipo de célula a tratar y una mayor eficacia en la transducción génica.

La Terapia Génica debe garantizar una adecuada transferencia de los genes a las células con objeto de que se expresen correctamente y en la cantidad necesaria. Los genes insertados pueden integrarse en los cromosomas de las células, con lo que el gen puede perpetuarse

tras la división celular, o quedar como elementos extracromosómicos (episomas). Los procedimientos de transferencia génica son muy variados y pueden utilizarse vectores no virales o vectores virales. Estos últimos, constituyen el método más eficaz. Los vectores virales se obtienen por la eliminación de genes propios de la replicación del virus y su sustitución por el gen terapéutico. Así el virus mantiene la capacidad de infectar a la célula pero no de multiplicarse produciendo partículas virales.

La aplicabilidad de la Terapia Génica viene condicionada por varios factores: i) El tipo de herencia ya que las enfermedades que vienen determinadas por un único gen son más propicias para el tratamiento con Terapia Génica que las multifactoriales, que dependen de la acción de varios genes junto con factores ambientales; ii) El patrón de herencia ya que las enfermedades recesivas plantean menos problemas al tratamiento con Terapia Génica, ya que debido a su carácter recesivo podría ser suficiente una sola copia del gen para recuperar la funcionalidad mientras que, en una enfermedad dominante, se tendría que recurrir a la mutación dirigida del gen dañado; iii) La naturaleza de la mutación porque cuando la mutación es por pérdida de función del gen o porque la propia proteína es no funcional se solucionaría el defecto con la introducción de una copia correcta del gen, mientras que las mutaciones de ganancia de función necesitan un bloqueo del gen mutado o corrección dirigida de la mutación; iv) El tamaño del gen a insertar ya que los genes con secuencias de pequeño tamaño son más fáciles de transferir al interior de las células, mientras que los genes de gran tamaño presentan, sin embargo, la dificultad de encontrar un vector adecuado a esta circunstancia.

La Terapia Celular puede definirse como el trasplante de células vivas a un organismo con el fin de reparar un tejido y las funciones perdidas. Quizá el criterio más claro para diferenciar la Terapia Génica de la Terapia Celular reside en el tipo de método empleado. En Terapia Génica el procedimiento más común es *in vivo*. En el caso de la Terapia Celular, lo más normal es que se trate de una técnica *ex vivo*, por la cual la modificación celular se realiza en células humanas cultivadas en un laboratorio, y no directamente sobre el paciente. Otra característica diferencial es que en Terapia Génica se transfecta la célula diana con un gen mientras que en Terapia Celular, aunque también se pueden transfectar, lo habitual es que se reimplanten las células expandidas simplemente sin modificar. Estas células pueden proceder del propio paciente en cuyo caso se denominan autólogas o bien proceder de otro individuo (heterólogas). En cualquier caso, se realiza su expansión *in vitro* en cultivo y se preparan para su posterior trasplante en el paciente (medicina regenerativa). La ventaja de utilizar las células del mismo individuo es que se evitan los tratamientos supresores para suprimir la respuesta inmunológica de rechazo.

Las células empleadas pueden ser células madre o células ya especializadas que son aquellas que mantienen su funcionalidad dentro del tejido dañado, en el caso de realizar un cultivo de crecimiento, o bien células cancerosas para ser modificadas genéticamente, aunque si se tratase de células madre, además de los factores de crecimiento, serían necesarios factores específicos que determinarían la diferenciación hacia el tipo celular que se desea cultivar.

Un tipo de células madre que se utilizan son las células embrionarias pluripotenciales provenientes de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días) y que pueden dar lugar a los diferentes tipos celulares del organismo (1). Otro posible origen de las células madre empleadas es el organismo adulto, que posee distintos linajes de estas células multipotenciales en localizaciones como la piel, sangre, médula ósea, epitelio intestinal, músculo cardíaco y esquelético, páncreas, cerebro y retina entre otras. Hasta ahora, se sabía que este tipo de células sólo podían generar células diferenciadas y especializadas del tejido donde residían; pero se ha comprobado que estas células en cultivo y expuestas a distintas condiciones pueden transdiferenciarse, es decir, son capaces de reprogramarse y dar lugar a otros tipos celulares que se pensaba que eran incapaces de generar.

La conjunción Terapia Génica-Terapia Celular y su aplicación en clínica

Como se ha explicado anteriormente, la modificación *ex vivo* de células mediante manipulación genética (**Figura 1**) constituye la acción conjunta de los dos métodos protagonistas de este capítulo. Se combinan de este modo dos técnicas eficaces que, en conjunto, permiten un variado rango de posibilidades, ya que, como se ha dicho, en el procedimiento *in vivo* resulta más compleja la manipulación genética de células madre y su proliferación controlada, puesto que en muchos casos estas células degeneran en un tumor por su alto grado de división celular. El inconveniente de que el método sea *ex vivo* reside en que, tras la manipulación, el tejido debe ser devuelto lo más puro posible al individuo, evitando de este modo un rechazo potencial o cualquier tipo de disfunción celular tras la modificación fuera del organismo.

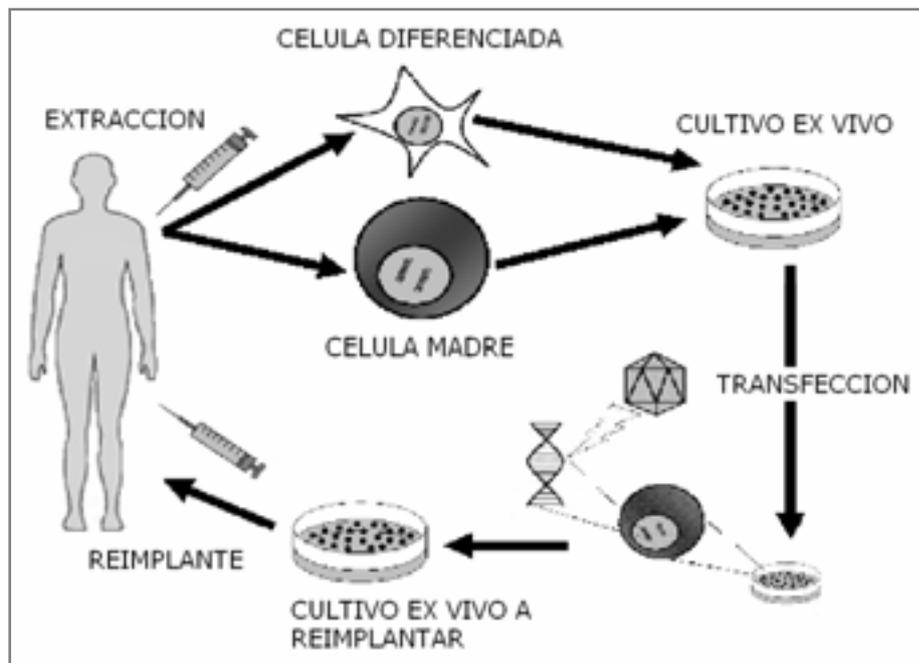


Figura 1. Conjunción Terapia Génica-Terapia Celular.

Deficiencia de Adenosina Deaminasa (ADA)

Se trata de una enfermedad con un patrón de herencia autosómica recesiva. Esta deficiencia se caracteriza por originar una disfunción en los linfocitos T y B reduciéndose así la capacidad del sistema inmunitario para combatir las infecciones. Los síntomas suelen aparecer en el primer año de vida y obligan al niño a permanecer en una "burbuja" con el objetivo de evitar cualquier posible infección.

En 1990 se comenzó el tratamiento de esta enfermedad mediante Terapia Génica. Los niños que fueron tratados entonces para esta mutación iniciaban una respuesta inmune eficaz, pero al final no eran capaces de superar la enfermedad. Esta fue, además, la primera dolencia tratada con éxito mediante técnicas de Terapia Génica *ex vivo* y es precisamente el tipo de enfermedad en el que se realizan actualmente la mayor parte de los ensayos de Terapia Génica combinada con Terapia Celular (2).

Hipercolesterolemia familiar congénita

Es una enfermedad monogénica de herencia dominante. En los individuos que padecen esta disfunción existe una deficiencia de receptores para LDL (lipoproteína de baja densidad) que son, generalmente, sintetizados por el hígado. La principal consecuencia del exceso de

colesterol en sangre es el desarrollo de enfermedades coronarias. La Terapia Génica que se aplica en este caso suele realizarse mediante un método *ex vivo*, técnica iniciada en modelos de conejo WHHL ("*Watanabe Heritable Hyperlipidemic*") (3). Los hepatocitos de un cultivo celular son transducidos con retrovirus que contienen la copia correcta para la proteína receptora del LDL (4).

Distrofia muscular de Duchenne

Se trata de un desorden severo ligado al cromosoma X que únicamente afecta a los hombres y que se manifiesta con un deterioro muscular progresivo. La proteína implicada es la distrofina, la cual se relaciona con el mantenimiento de la forma y la estructura muscular debido a su función de unión al citoesqueleto y a la matriz celular. Al principio, la regeneración natural de las fibras musculares frena los síntomas de esta enfermedad, si bien, con el tiempo, la velocidad de regeneración se ve superada por la de degeneración. Este hecho puede llevar al paciente a una parálisis total e incluso a la muerte.

El tratamiento con Terapia Génica se realiza en la mayoría de los casos mediante virus adenoasociados, pero también se emplean retrovirus. A parte de la terapia *in vivo*, se han realizado estudios de modificación genética *ex vivo* de mioblastos. Asimismo, se ha comprobado la similitud entre la distrofina y la utrofina, abriéndose así nuevas expectativas de curación con respecto a esta proteína implicada en los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne, ya que la utrofina ofrece en ocasiones mejores resultados que la propia distrofina (5).

Fibrosis quística

Puede ser definida como una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva que se debe a la mutación en el CFTR ("*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*") que funciona como canal de cloro y, además, regula otras rutas de transporte como, por ejemplo, la absorción de sodio. El defecto en este gen tiene como consecuencia un transporte anormal de los electrolitos en las glándulas exocrinas, conduciendo a una obstrucción crónica en los pulmones, insuficiencia pancreática exocrina y un aumento de electrolitos en el sudor.

El protocolo de Terapia Génica para el tratamiento de esta enfermedad consiste en utilizar las células del epitelio respiratorio y, mediante liposomas o vectores virales, introducir en esas células el gen correcto de CFTR. Los métodos *in vivo* e *in situ* son los más empleados en estos casos, aunque también se están conjugando técnicas de Terapia Celular junto a las modificaciones genéticas (6).

Cáncer

Es uno de los campos en los que más se está investigando por su alto grado de incidencia a nivel mundial. En el caso concreto de esta enfermedad, no se trata de corregir un defecto genético como ocurre en el caso de las enfermedades monogénicas o poligénicas. Aquí, la Terapia Génica tiene como objetivo la destrucción de las células tumorales. Las distintas estrategias que se están llevando a cabo en Terapia Génica (7) tratan de: i) Incrementar la actividad antitumoral de células inmunes por medio de citoquinas como las interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, etc.; ii) Introducir un gen suicida o de sensibilidad aumentada a ciertos fármacos; iii) Bloquear la expresión de oncogenes mediante oligonucleótidos antisentido; iv) Introducir genes supresores de tumores (p53); v) Aumentar la inmunogenicidad del tumor a través de la introducción de "vacunas tumorales" y vi) Transferir genes con efecto antiangiogénico, para inhibir la formación de vasos sanguíneos inducidos por el tumor.

Enfermedades neurodegenerativas

En este campo también se realizan ensayos de Terapia Génica *ex vivo*, como por ejemplo, en casos de Alzheimer o Parkinson (8). El Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común en todo el mundo y se caracteriza por una demencia progresiva que tiene como uno de sus primeros síntomas el deterioro de la memoria. El paciente empeora progresivamente mostrando un déficit perceptivo, lingüístico y emocional a medida que la enfermedad va avanzando. En el cerebro de estas personas se forman placas y ovillos de fibras que lo van recubriendo. La atribución de un origen genético para la enfermedad del Alzheimer se ha propuesto recientemente, sin haber logrado todavía, no obstante, un conocimiento exacto de todos los posibles factores que pueden influir en el desarrollo de esta enfermedad. Se han realizado distintas aproximaciones para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en humanos. Un ejemplo de ello es la sobre expresión de la proteína calbindina d28K en cultivo de neuronas de hipocampo de rata, donde se observó que confería protección frente al fragmento 25-35 del péptido β amiloide (9).

El Parkinson, por su parte, es una enfermedad neurológica crónica que consiste en la alteración progresiva de la zona del mesencéfalo, área cerebral que se asocia al control y coordinación del movimiento. Se produce una disminución de la dopamina, sustancia neurotransmisora del impulso nervioso. El paciente experimenta rigidez corporal, dificultades para andar, temblor y alteraciones en el control de los movimientos, entre otros síntomas. Por otro lado, la enfermedad de Corea de Huntington se trata de una degeneración de las neuronas del ganglio basal debido a una mutación que consiste en la repetición anormal del triplete CAG en la secuencia del DNA del cromosoma 4. Un posible tratamiento podría ser el uso de factores neurotróficos mediante Terapia Celular con objeto de regenerar las neuronas muertas (10).

El mayor inconveniente de las técnicas de Terapia Celular es encontrar una célula que sobreviva mucho tiempo a nivel cerebral y que no sea rechazada por el paciente.

Hemofilia

La hemofilia es una enfermedad de origen congénito ligada al cromosoma X y que se caracteriza por la deficiencia de los factores de la coagulación VIII o IX. En consecuencia, el individuo sufre trastornos de la coagulación.

Están siendo investigadas distintas estrategias para la transferencia de los genes que permitieran al paciente la síntesis continua de los factores VIII (en la hemofilia A) y IX (en la hemofilia B) (11). Se han logrado grandes avances en la expresión de estos factores mediante la transferencia *in vivo* de vectores, fundamentalmente adenoasociados, en modelos animales.

Infección por el VIH

En la actualidad, esta infección se considera una enfermedad genética adquirida, ya que el virus al retrotranscribir su RNA genómico integra el DNA resultante en el cromosoma de la célula que infecta, modulando sus funciones y suprimiendo el sistema inmune.

Dos claros propósitos son los que tiene la Terapia Génica en esta patología (12). El primero de ellos sería la protección de las células no infectadas y el segundo la destrucción de aquellas que ya poseen el virus. Se han realizado distintos estudios para el tratamiento de esta infección mediante Terapia Génica, tanto *in vitro* en líneas celulares como *in vivo* en modelos animales.

En la actualidad, se están ensayando distintos protocolos clínicos de Terapia Génica para tratar esta infección mayoritariamente con técnicas *ex vivo*. El protocolo consiste en extraer células del paciente y, por inyección directa o por vectores virales, se inserta el gen terapéutico. Las células que han incorporado y expresado el transgén son reintroducidas al paciente por vía intravenosa.

Las estrategias utilizadas en los ensayos clínicos realizados en Terapia Génica para la infección por el VIH se han basado en: i) Introducir genes inhibidores de la replicación viral en monocitos y linfocitos T con el objetivo de inhibir la producción del VIH; ii) Utilizar oligonucleótidos antisentido complementarios en secuencia génica al VIH para la formación de "dúplex" que bloqueen la traducción; iii) Transferir genes de proteínas mutadas del VIH para su competencia con las proteínas nativas del virus con el objeto de dificultar el ensamblaje del virus o inhibir su replicación; iv) Uso de ribozimas para que uniéndose a secuencias complementarias del RNA diana puedan romperlo con su actividad ribonucleasa, y v) Introducir genes en las células diana que codifiquen anticuerpos frente a las proteínas del VIH y así bloquear su ciclo biológico.

Diabetes

La diabetes mellitus tipo I se caracteriza por un proceso autoinmune de destrucción de las células productoras de insulina, mientras que la de tipo II aparece por combinación entre la resistencia a la acción de la insulina por parte de los tejidos y una función alterada de la célula pancreática.

En la actualidad, las terapias que existen para la enfermedad no suponen su curación, por lo que el trasplante de islotes pancreáticos es una técnica prometedora para restaurar la funcionalidad de las células en los pacientes. Sin duda, hay que contar con que la técnica tiene limitaciones como el gran número de páncreas necesarios para la obtención de los islotes y el rechazo del injerto.

En pacientes con diabetes tipo I la Terapia Génica (13) trata de modificar la respuesta anómala del sistema inmunitario y de incrementar el número de células que secreten insulina. Las estrategias de actuación sobre la respuesta inmune se han basado en: i) La prevención de la inflamación previa a la destrucción de células β estimulando la expresión de interleuquina 4; ii) La inhibición de moléculas como la interleuquina 1, interferón γ , óxido nítrico e interleuquina 6, implicadas en el desarrollo de la diabetes tipo I, y iii) La producción de anti-CD4 en células modificadas genéticamente por su importante papel en la activación de linfocitos T.

Con objeto de incrementar las células β , la Terapia Génica ha tratado de crear células distintas a las β que secreten insulina, y es en los hepatocitos donde se han obtenido los mejores resultados. Los hepatocitos son capaces de captar la glucosa del exterior ya que, al igual que las células β , poseen el receptor de membrana GLUT2. Si además este receptor está modificado, también pueden secretar insulina con una funcionalidad similar a la producida por el páncreas. Mediante la introducción del gen PDX-1, implicado en la expresión del gen de la insulina en las células β del páncreas, se ha conseguido la secreción de insulina en los hepatocitos del hígado de ratones a los que se les había inducido diabetes.

Otra aproximación es la modificación de los hepatocitos de animales de experimentación para que adquieran características de células β mediante la introducción de los genes *Btc* y *Neurod*. Con esta técnica se ha observado que esos hepatocitos sufren una transformación hacia islotes pancreáticos con la consiguiente producción de insulina.

Regeneración del miocardio

La Terapia Celular en cardiología tiene como objetivo impedir la aparición de insuficiencia cardíaca tras el infarto de miocardio (14).

Actualmente, los avances en el trasplante cardíaco y el tratamiento con fármacos no están resultando suficientes para reducir la gran mortalidad que se deriva de muchos episodios cardiovasculares. Por tanto, el trasplante celular para regenerar el tejido dañado es una gran alternativa para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, ya que el fin

último del implante de células es inducir el crecimiento de nuevas fibras musculares cardíacas y activar la angiogénesis en el miocardio dañado. Ya en 1992 se emplearon mioblastos indiferenciados cultivados para poder regenerar el miocardio en modelos animales y en el año 2000 se comenzó su aplicación en humanos.

Las células empleadas en la Terapia Celular para la regeneración miocárdica pueden ser de distintos orígenes pero, el uso de células autólogas, suprime rechazos inmunológicos y evita problemas bioéticos. Los distintos tipos de células que pueden emplearse para este objetivo son: células madre cardíacas, musculares lisas, mioblastos esqueléticos, células madre de médula ósea y células madre embrionarias.

Los resultados obtenidos hasta el momento en Terapia Celular para la regeneración del miocardio muestran un incremento de contractibilidad de las células implantadas, aunque con algún episodio de arritmia. Se ha demostrado que el implante de células musculares aumenta la elasticidad, previniendo cambios en las estructuras ventriculares. Entre los efectos beneficiosos de esta Terapia Celular destacan la reducción del tamaño de la cicatriz en el área del infarto, aumento del grosor de la pared del ventrículo izquierdo y su distensibilidad, así como un incremento en la contractibilidad del miocardio.

Estudios más actuales que combinan Terapia Génica y Terapia Celular

Actualmente, están en marcha cerca de 700 ensayos clínicos de Terapia Génica en todo el mundo de los cuales muchos no emplean únicamente un tipo de terapia, sino que conjugan la Terapia Génica y la Terapia Celular con resultados, en algunos casos, más eficaces que su aplicación por separado. Se combina el uso curativo de las células del propio paciente con las propiedades que confiere la manipulación genética de éstas. En algunos casos, la Terapia Génica *ex vivo* se usa como una técnica paliativa; en otros casos, sólo es un medio de comprobación de parámetros celulares que no se obtienen fácilmente *in vivo*.

Inmunodeficiencia severa combinada debida a una deficiencia en adenosina deaminasa

Este estudio (15) se ocupa de la deficiencia de adenosina deaminasa en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada. El tratamiento actual para esta dolencia se basa en la administración de PEG-ADA, que aumenta el número de células inmunes del paciente pero que no supone la curación de la enfermedad. Además, estos pacientes no son candidatos para un trasplante de médula HLA compatible.

El protocolo para la aplicación de Terapia Génica en este tipo de afección puede basarse en el aislamiento de células madre de cordón umbilical (en recién nacidos) o de la médula ósea (en el caso de individuos adultos), o bien en la obtención de células mononucleares (mediante aislamiento sobre gradiente de Ficoll) para su posterior manipulación en el laboratorio.

En este ensayo, en particular, se realiza la extracción de las células madre de la médula ósea. El siguiente paso consiste en aumentar el número de células del cultivo gracias a factores de crecimiento y, posteriormente, caracterizar la población obtenida. Una vez caracterizada una población homogénea de células se transfectan con el gen humano normal de ADA a través de vectores retrovirales. Después de la expansión de estas células modificadas se reimplantan en el paciente mediante inyección intravenosa.

Inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X

En este caso (16), nos encontramos ante un tipo concreto de inmunodeficiencia severa combinada en la cual los pacientes presentan, en la superficie de sus linfocitos, la cadena común gamma defectiva. Esto provoca una deficiencia en la producción de anticuerpos por

parte de los linfocitos B y la ausencia de linfocitos T en el individuo que sufre esta enfermedad.

Actualmente, la solución parcial de esta afección consiste en el trasplante de médula ósea de un donante compatible. Además de la dificultad que constituye de por sí la obtención de médula ósea y el que ésta no sea rechazada por el receptor, nos encontramos con que los individuos tratados de esta manera no recuperan un nivel funcional normal de su sistema inmune. Por ello, es necesario el desarrollo de terapias sustitutivas o complementarias como puede ser la Terapia Génica en conjunción con la Terapia Celular.

El procedimiento se basa primero, en obtener células madre hematopoyéticas del propio paciente, que son cultivadas, congeladas y preservadas en un banco de tejidos. Para iniciar la inserción del gen funcional se descongelan esas células y, finalmente, se les introduce el gen correspondiente gracias a un retrovirus para su posterior trasplante al mismo paciente. Este método evita el rechazo inmunológico en la mayor parte de los casos.

Hipercolesterolemia familiar

Uno de los más recientes ensayos clínicos para esta patología se basa en un ensayo *ex vivo* de Terapia Génica (17) que utiliza hepatocitos autólogos, genéticamente corregidos con retrovirus recombinantes que portan el gen del receptor para LDL. Se pretende lograr, de esta forma, un nivel adecuado de receptores funcionales e indirectamente niveles circulantes normales de colesterol. Los pacientes muestran un genotipo homocigoto para la hipercolesterolemia familiar congénita, cuyo fenotipo es la ausencia de este tipo de receptor. Se realizó con éxito la transducción y el posterior trasplante en el hígado del tejido modificado que se había obtenido *ex vivo*. El resultado fue la corrección estable de la deficiencia de receptores para LDL durante 18 meses de tratamiento.

También en este sentido se está llevando a cabo otro ensayo de seguridad y viabilidad de un protocolo de Terapia Génica *ex vivo* (18) en el que se utilizan hepatocitos aislados de cinco pacientes con edades entre los 7 y los 41 años. El posterior trasplante se lleva a cabo a través de la reinfusión de una suspensión relativamente densa de células autólogas modificadas, todo ello a través de un catéter situado en una vena afluyente de la vena porta. La ausencia de trombosis en la vena porta, de anomalías en las pruebas de funcionamiento del hígado y en los parámetros hematológicos, hizo de este trasplante un éxito. Además, se comprobó que la posición más eficaz del catéter correspondía a la vena inferior mesentérica, obteniendo peores resultados cuando se utilizaba la vena gástrica izquierda.

La conclusión final es que la Terapia Génica *ex vivo* en hígado no parece que pueda ser aplicada a gran escala, pero sí se puede asegurar que es una técnica factible y relativamente segura. La aplicación de este procedimiento podría realizarse en pacientes seleccionados en función de que su enfermedad metabólica mostrara signos evidentes de poder ser corregida de manera significativa de esta forma.

Distrofia muscular de Duchene

La inyección de mioblastos en ratones histocompatibles (19), da lugar a un problema que se han tenido que solventar en los últimos años como es la degeneración de las células transplantadas por el sistema inmune. Para la aplicación de Terapia Génica y Terapia Celular los mioblastos deben ser aislados, mediante biopsias musculares, y cultivados *in vitro*, donde se transducen con el vector apropiado para finalmente ser reinyectados en uno o más músculos del paciente del que fueron extraídos. Pero existen dos problemas adicionales más como es la dificultad de producir el vector apropiado para acoger al gran cDNA de la distrofina o de la utrofina, y por otro lado la baja vida media de las células miogénicas aisladas de los pacientes.

La capacidad proliferativa de los precursores miogénicos decae considerablemente durante el periodo temprano de crecimiento postnatal, en paralelo a la reducción progresiva de la longitud del telómero, lo cual sucede en las dos primeras décadas de la vida. Además, las células miogénicas de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne reducen su capacidad mitótica a lo largo de los muchos ciclos de regeneración-degeneración.

Las células obtenidas de la biopsia y que se encuentran creciendo *in vitro* sufren rápidamente una disminución en sus funciones, pero pueden ser tratadas mediante Terapia Génica, introduciendo en ellas vectores retrovirales que porten el gen normal. La baja vida media hace difícil obtener un gran número de células modificadas *ex vivo* y, por tanto, aporta pocas esperanzas a la hora de considerarlo un método eficaz de curación. Para evitar este hecho, en este ensayo se transdujeron las células con vectores retrovirales que aportasen cierto tipo de "inmortalización". También se ha intentado transducir fibroblastos con el gen MyoD incluido en un vector adenoviral. Es, en definitiva, una alternativa a la terapia con mioblastos. En cualquier caso, las últimas investigaciones al respecto se dirigen hacia la utilización de células madre de la médula ósea.

Otro ensayo interesante es el que se realiza utilizando un sistema de liberación de microdistrofina con el objetivo de regenerar el tejido muscular utilizando células madre (20). En este ensayo, se aislaron células MSP ("*muscle side population*") que se cultivaron *in vitro*. Posteriormente, se introdujo en ellas el gen normal gracias a vectores lentivirales autoinactivos. El trasplante de estas células dio como resultado la fusión de miofibras en los ratones empleados en el estudio y la detección de células que expresaban distrofina. Este dato hace pensar que este tipo de terapias puedan ser una buena alternativa a los problemas derivados de las distrofias musculares.

Fibrosis quística

La Terapia Génica para pacientes que sufren fibrosis quística puede ser realizada mediante métodos *ex vivo* o *in vivo*. La mayoría de los ensayos suelen aplicar técnicas de Terapia Génica *in vivo*, aunque existen varios ensayos en los que se realiza una manipulación *in vitro* de las células extraídas del paciente. En este último caso, se han utilizado células progenitoras de la médula ósea en condiciones de esterilidad para su posterior manipulación genética y transducidas mediante lipoplejos (21).

A diferencia de lo que hemos ido viendo hasta ahora, el desarrollo de las células modificadas *in vitro* se suele emplear para investigar la función del gen CFTR, y no como método de curación de la enfermedad por trasplante del tejido normalizado. Se ha comprobado una buena eficacia del uso de la terapia *in vivo*, en la cual se emplean aerosoles que llevan al epitelio respiratorio los liposomas o los vectores adenovirales que portan el gen de CFTR.

Los resultados más recientes (22) demuestran que los vectores virales tales como adenovirus y virus adenoasociados son poco eficaces debido a su alta inmunogenicidad que reduce la eficacia de cada dosis administrada al paciente. El empleo de vectores no virales ha sido más exitoso en cuanto a la disminución de la respuesta inmune, pero este tipo de vectores han demostrado ser menos efectivos en cuanto a la transferencia del gen. En muchos casos, la mortalidad de los pacientes que sufren fibrosis quística se debe a una inflamación pulmonar preexistente; por ello, es muy importante que el vector no cause o agrave esta condición.

Los modelos *in vitro* utilizando células epiteliales bronquiales humanas de la fibrosis quística demuestran una reducción isotónica en el volumen de líquido superficial de las vías aéreas y, por lo tanto, un deterioro en el movimiento de las mucosidades superficiales. Se ha probado en estas condiciones la toxicidad de los liposomas catiónicos y también la eficacia del empleo de plásmidos de DNA como vectores del gen normal. A cualquier dosis de DNA plasmídico se obtiene una buena eficacia y no se observa toxicidad local ni sistémica.

Como hemos visto, el uso de la Terapia Génica *ex vivo* se suele emplear en los ensayos de fibrosis quística para comprobar la eficacia de los vectores o comprobar parámetros celulares únicamente, y no se suele utilizar como un método de curación de la enfermedad.

Vacunación con células autólogas de cáncer de pecho modificadas que secretan factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

En este ensayo (23), además de combinar Terapia Génica y Terapia Celular, se emplea radiación para evitar que las células tumorales continúen dividiéndose, pues será en ellas donde se inserte por Terapia Génica el gen productor de GM-CSF, una hormona que estimula el sistema inmune del paciente.

Para conseguir este resultado, será necesario tomar una muestra quirúrgica del tumor o bien obtener fluido del que podamos aislar esas células tumorales. Ya en el laboratorio se procederá a la fabricación de la vacuna. Con este fin, se inserta en las células tumorales, mediante adenovirus, el gen que las permita secretar la hormona GM-CSF que estimula el sistema inmune, favoreciendo la formación de colonias de granulocitos-macrófagos. La vacunación seguirá unas pautas establecidas, en las cuales se combinará en algunos casos la vacuna (células tumorales manipuladas genéticamente) junto con la inyección de células irradiadas no transducidas en diferentes zonas del paciente. Éstas servirán para determinar si el sistema inmune está respondiendo a las células tumorales metastásicas.

Administración de células dendríticas (DCs) autólogas transfectadas con adenovirus que portan el gen Her-2

En este ensayo (24) se conjuga la Terapia Génica y la Terapia Celular pero además se aprovecha el papel de la célula dendrítica como "educador" inmune. Las células dendríticas atrapan a los antígenos ya sean virus, bacterias u otros organismos y los presentan a las células T para reclutar su ayuda en la respuesta inmune. En el caso del cáncer, estas células dendríticas no reconocen como extrañas a las células cancerosas.

Se persigue por tanto que modificando las células dendríticas, éstas sean capaces de activar una respuesta autoinmune de tipo especial que incluya un ataque de las células T contra las células cancerosas. Para ello, se cultivan las células dendríticas de un paciente y se les inserta el antígeno específico del tumor a tratar lo que lleva a la expresión de MHC-I y MHC-II. Las moléculas MHC ("*major histocompatibility complex*") son glucoproteínas que procesan antígenos del interior de las células y los presentan a las células T. Se logra así que las células dendríticas maduren y desplieguen los mismos antígenos del tumor que aparecen en las células cancerosas. Cuando estas células dendríticas son reimplantadas en el paciente, presentan sus nuevos antígenos al sistema inmunológico y las células T responden específicamente frente a esos antígenos.

Dentro de los distintos tipos de tumor mamario, el cáncer de mama Her2 positivo se caracteriza por una mayor cantidad de la proteína Her2 en la superficie de las células tumorales. Este es el tipo de cáncer de pecho más agresivo y hacia el cual se dirige este ensayo clínico. La transducción del gen se realiza con un adenovirus, que es vector del gen Her-2/neu (bajo el control del promotor humano MMTV).

Ensayo clínico en Fase I con factor de crecimiento neuronal para la enfermedad de Alzheimer

La pérdida de neuronas colinérgicas (aquellas que fabrican acetilcolina para utilizarla como sustancia neurotransmisora) es uno de los síntomas más notables en la enfermedad de Alzheimer. La integridad de estas neuronas depende de la acción del NGF ("*Nerve Growth Factor*"), factor producido por las células nerviosas del hipocampo que a su vez son diana de las moléculas de acetilcolina. De este modo, se produce una interacción recíproca en la cual las neuronas que segregan acetilcolina activan las terminaciones axónicas de las neuronas

del hipocampo, que segregan entonces el NGF. Este factor debe ser captado por las neuronas colinérgicas que lo transportarán de manera retrógrada hacia el cuerpo de la neurona para llegar al núcleo, donde el NGF realizará su función de mantener la viabilidad de la neurona. En la enfermedad de Alzheimer hay una interrupción en este transporte retrógrado, por lo que la neurona colinérgica degenera y pierde su capacidad de activar las células del hipocampo por la acetilcolina.

En este ensayo en fase I (25) se emplean fibroblastos autólogos genéticamente modificados de ocho individuos con la enfermedad de Alzheimer en un grado leve, para que expresen NGF humano (**Figura 2**). Estos fibroblastos manipulados genéticamente son inyectados en la zona del telencéfalo y el diencéfalo para actuar como fuentes del factor de crecimiento. Durante el proceso se observa una mejoría del declive cognitivo y no se aprecian reacciones adversas.

Utilización de astrocitos primarios transducidos por retrovirus que portan el gen de la tirosina hidroxilasa para la enfermedad de Parkinson

El grupo de Cortez y colaboradores (26), han utilizado un sistema de transferencia retroviral para la modificación de los astrocitos primarios con un transgén que expresa tirosina hidroxilasa (enzima que produce DOPA a partir de la tirosina) bajo el control transcripcional de un promotor humano de la GFAP ("*glial fibrillary acidic protein*").

Las células así manipuladas fueron probadas en un modelo para la enfermedad de Parkinson. El método se basa en la propiedad de los astrocitos de formar parte del tejido neural, de presentar una mayor vida media, de ser más resistentes al estrés oxidativo que las neuronas y de poseer un eficaz sistema secretor. El promotor de la GFAP es activo a lo largo de la vida postnatal.

Las células así manipuladas fueron insertadas en modelos de ratas para, de este modo, comprobar su eficacia. Los astrocitos indujeron una reducción significativa en el comportamiento que se produce en respuesta a la apomorfina (agonista dopaminérgico) durante las 4 semanas siguientes al tratamiento. Además, el mRNA y la proteína transgénica se podían detectar a nivel cerebral. Dichos resultados muestran que se podría adaptar el sistema a un vector retroviral para obtener el suficiente nivel de actividad génica y lograr así un efecto prolongado de su expresión. Estos datos señalan a los astrocitos como el futuro para la Terapia Génica en el sistema nervioso central.

Utilización de células madre mesenquimales de tejido adiposo y genes suicidas para el tratamiento del cáncer

Las células mesenquimales, como así se detalla en el capítulo 6 de este mismo libro, son una fuente de células madre muy prometedoras para la Terapia Génica y la Terapia Celular. Kucerova y colaboradores (27) han introducido un gen suicida en este tipo de células utilizando una construcción en levadura formada por citosina deaminasa-uracil fosforribosiltransferasa, utilizando para la transducción un retrovirus. Se ensayó en células neoplásicas de colon utilizando la 5-fluorocitosina como prodroga que induce la apoptosis celular. Los resultados demostraron la migración al tumor de este tipo de células así transfectadas que liberan el gen suicida para ejercer el efecto citotóxico esperado de forma localizada y específica.

Aspectos éticos en la aplicación clínica de la Terapia Génica y la Terapia Celular

Todo el progreso que se ha hecho patente en el campo de la Biomedicina, gracias a la Terapia Génica y Celular, suscita grandes interrogantes sobre el alcance y el límite de estos avances tanto a nivel científico como a nivel social en general.

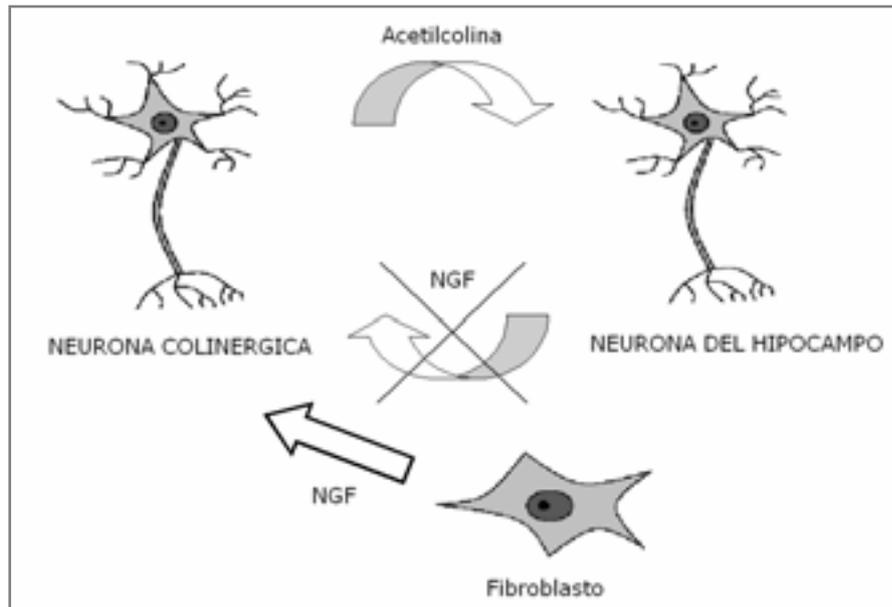


Figura 2. Restablecimiento de los niveles de NGF utilizando fibroblastos.

La transferencia de genes puede realizarse en células germinales o en células somáticas. Todos los ensayos clínicos que se llevan a cabo hoy día en Terapia Génica se realizan en células somáticas, ya que de esta manera la información genética transferida no afecta a la descendencia del paciente. La Terapia Génica en células germinales, al variar la identidad genética germinal del ser humano, no se permite por ley. La posibilidad de modificar genéticamente las células germinales está creando muchos interrogantes sobre el derecho, si es que existe, para manipular y alterar el patrimonio genético del individuo que hasta ahora sólo se ha ido produciendo a través de la propia evolución.

Otro aspecto que se contempla en la legislación es el objetivo con que se realiza la Terapia Génica. Esta técnica únicamente está permitida para fines terapéuticos, es decir, para el tratamiento de enfermedades y nunca con fines eugenésicos, en los que se trataría de mejorar la raza seleccionando ciertas características de la población.

Existen distintos aspectos éticos a considerar en cuanto al uso de los vectores virales en Terapia Génica. Mientras que los vectores no virales, como los liposomas, no han planteado problemas de tipo ético, el uso de vectores virales, diseñados para incrementar la eficacia de transferencia de la información genética, ha provocado un gran debate por la posibilidad de que puedan crearse partículas virales activas. Pero como en cualquier innovación terapéutica, este riesgo está siendo analizado frente a los beneficios de la técnica.

Por otra parte, la utilización de células madre embrionarias en Terapia Celular, por su gran potencial terapéutico, conlleva importantes problemas éticos en cuanto a su obtención, ya que supone manipular y dañar incluso a un embrión. Por este motivo, muchos investigadores se decantan por la utilización de células madre adultas, ya que mantienen la idea de respetar al embrión por constituir el inicio de una nueva vida. Además, piensan que las células madre de los tejidos adultos al estar más diferenciadas que las embrionarias facilitan la labor de orientación en el desarrollo celular y tienen una menor tendencia a generar tumores. Por el contrario, otro sector científico opina que el embrión no puede entenderse, en ese estadio, como un ser humano, y por tanto no debe, su manipulación plantear ningún problema ético.

A la vista de esta controversia, será necesario que se aclaren y definan bien los conceptos éticos para el desarrollo de terapias seguras y que supongan un beneficio para el paciente.

Futuro de la Terapia Génica y de la Terapia Celular

En todos los estudios que se han presentado en este capítulo, se combinan de una forma eficaz la Terapia Génica y la Terapia Celular. De una parte la Terapia Génica asegura la capacidad de manipular el genoma celular para corregir las deficiencias que causan los distintos síntomas de las enfermedades, con el objetivo de poder tratarlas con garantías. De otra parte, la Terapia Celular aporta un amplio abanico de posibilidades, puesto que la manipulación *in vitro* de las células evita ciertos efectos secundarios no deseables. Por otro lado, la utilización conjunta de estas terapias presenta dos ventajas, tal y como se ha comprobado en algunos de los estudios anteriores: por una parte la curación de la afección tratada mediante el trasplante del tejido funcional obtenido *in vitro* y por otra el análisis de parámetros celulares antes y después del uso de técnicas de modificación genética.

Además, como hemos advertido, el empleo de la Terapia Génica *ex vivo* tiene ciertas ventajas como, por ejemplo, la transducción del gen mediante métodos físicos, posibilidad que contribuye a la seguridad y control sobre el ensayo realizado. Pero también se han de tener en cuenta los inconvenientes de la Terapia Génica *ex vivo*, como por ejemplo, que su aplicación sería individualizada, caso contrario al del método *in vivo*, del cual se puede realizar una producción del protocolo “en masa”. Esto es, para cada paciente tratado con Terapia Génica *ex vivo* se han de cultivar o bien sus propias células o las de un donante compatible, mientras que en el caso del método *in vivo* el mismo tipo de vector puede ser empleado en diferentes pacientes. Además, a parte de los posibles problemas que pueden aparecer durante la manipulación *in vitro* y el posterior trasplante, nos encontramos con que el uso de la Terapia Génica no asegura, a veces, una inserción completa del gen pues se pueden presentar efectos secundarios relativos al vector, algunos leves como el rechazo inmunológico y otros graves como los choques anafilácticos masivos o los procesos leucémicos por mutagénesis insercional. En cualquier caso se hace ineficaz el vector.

No obstante, pese a que la conjunción Terapia Génica y Terapia Celular no es, ni mucho menos, la panacea médica actual, sí nos abre un campo de posibilidades alentador en el propósito de alcanzar la solución a ciertas enfermedades que, todavía hoy, se escapan a nuestros conocimientos médicos. De hecho, debido a que la Terapia Génica es una técnica con gran potencial terapéutico a pesar de las dificultades que conlleva, muchas empresas biotecnológicas han apostado por ella, aunque en este caso no se pueda hablar de un protocolo universal —siempre más rentable— sino que se deberán aplicar distintos métodos dependiendo de las enfermedades a tratar y de las características clínicas del paciente. Esto significa que no se deberá invertir todo el esfuerzo ni todos los recursos económicos en una aplicación determinada, sino que la tecnología deberá ser lo más amplia posible.

Existen muchas diferencias en cuanto a la aplicación de la Terapia Génica, ya que la reglamentación difiere mucho entre los distintos países. Debido a que en Europa existen muchas más limitaciones, la mayoría de las pruebas clínicas se realizan en Estados Unidos y otros países. Un problema añadido es que las empresas y los distintos laboratorios que trabajan en Terapia Génica tienen que poder acceder a los genes, pero esto es muy costoso económicamente porque la mayoría están patentados.

La Terapia Génica no ha avanzado tan deprisa como se predecía, pero el progreso no ha parado en cuanto al conocimiento de las distintas enfermedades, en cuanto a la identificación de dianas terapéuticas más adecuadas y en cuanto a la seguridad y eficacia de los vectores. También se están intentando mejorar los ensayos en modelos animales para poder garantizar una mayor seguridad en cuanto a la toxicidad, para futuros ensayos clínicos de Terapia Génica en humanos.

En cuanto a la Terapia Celular, se debe seguir investigando sobre la biología de las células madre adultas para comprender mejor las señales que las hacen crecer y diferenciarse, ya

que se pretende que en un futuro se desarrollen sistemas para poder diferenciar y dirigir estas células en el paciente, sin necesidad de manipularlas *in vitro*. Además, los hallazgos sobre la plasticidad en el desarrollo de las células madre adultas, al poder reprogramar su diferenciación, plantea el que estas células puedan reemplazar a las células madre embrionarias en un futuro.

Se afirma que la combinación de la Terapia Génica y la Terapia Celular representará la solución más efectiva para muchas patologías como el cáncer, las inmunodeficiencias, las enfermedades metabólicas, las enfermedades autoinmunes, las cardiovasculares o las infecciosas. Por este motivo, se está poniendo mucho empeño en que se inviertan más recursos económicos en este tipo de investigaciones biomédicas.

Hay que ser optimistas, pero también sabemos que en el desarrollo de estas técnicas queda mucho camino por recorrer y no se deben crear falsas esperanzas a los pacientes, ya que la Terapia Génica y la Terapia Celular son aún procedimientos experimentales. Por este motivo, los medios de comunicación deben transmitir a la sociedad tanto los éxitos como los fracasos de una forma clara y real.

Como conclusión, se podría decir que tanto la Terapia Génica como la Terapia Celular representan la Medicina del futuro para el tratamiento de enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. Hasta el momento, los avances en ambos tipos de terapias han demostrado que se debe seguir en esta dirección investigadora para poder llegar a manipular tanto los vectores como las células diana con mayor eficacia y seguridad.

Referencias

1. Mato ME (2004) Células madre: Un nuevo concepto de medicina regenerativa. Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol15_2_04/end07204.htm
2. Molecular and Clinical Studies of Primary Immunodeficiency Diseases. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00006319;jsessionid=A4FCE3B8FBFAFCA302DEA8EFBDD16873?order=2>
3. Ordovas JM (2002) La terapia génica en el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar. *Card Vasc Risk Factors* 11: 187-92. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://crf.medynet.com/contenido/2002/3/187-192.pdf>
4. Phase I Study of *Ex Vivo* Liver-Directed Gene Therapy for Familial Hypercholesterolemia. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00004809;jsessionid=A4FCE3B8FBFAFCA302DEA8EFBDD16873?order=1>
5. Onori A, Desantis A, Buontempo S, Di Certo MG, Fanciulli M, Salvatori L, Passananti C, Corbi N (2007) The artificial 4-zinc-finger protein Bagly binds human utrophin promoter A at the endogenous chromosomal site and activates transcription. *Biochem Cell Biol*, 85: 358-65.
6. Figueredo J, Limberis MP, Wilson JM (2007) Prediction of cellular immune responses against CFTR in patients with cystic fibrosis after gene therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36: 529-33.
7. Gene-Modified White Blood Cells Followed By Interleukin-2 and Vaccine Therapy in Treating Patients With Metastatic Melanoma. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00085462;jsessionid=A4FCE3B8FBFAFCA302DEA8EFBDD16873?order=16>
8. A Study of AAV-hAADC-2 in Subjects With Parkinson's Disease. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00229736?order=2>
A Multi-Center Study for the Clinical Response of Choline Acetyltransferase and Apolipoprotein Epsilon Gene Polymorphisms to Donepezil in Alzheimer's Disease. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00381381?order=5>
9. Greene JR, Radenahmad N, Wilcock GK, Neal JW, Pearson RC (2001) Accumulation of calbindin in cortical pyramidal cells with ageing: a putative protective mechanism which fails in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27: 339-42.
10. Yasuhara T, Date I (2007) Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: Toward clinical application. *Cell Transplant*, 16: 125-32.
11. Pierce GF, Lillcrap D, Pipe SW, Vandendriessche T (2007) Gene therapy, bioengineered clotting factors and novel technologies for hemophilia treatment. *J Thromb Haemost*, 5: 901-6.
12. Lanao JM, Briones E, Colino CI (2007) Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. *Drug Target*, 15: 21-36.
13. D'Anneo A, Rood P, Bottino R, Balamurugan AN, He J, Giannoukakis N (2006) Gene therapy for type 1 diabetes: Is it ready for the clinic? *Immunol Res*, 36: 83-9.
14. White K, Nicklin SA, Baker AH (2007) Novel vectors for *in vivo* gene delivery to vascular tissue. *Expert Opin Biol Ther*, 7: 809-21.

15. Gene Transfer Therapy for Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) due to Adenosine Deaminase (ADA) Deficiency. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00018018>
16. Stem Cell Gene Therapy to Treat X-Linked Severe Combined Immunodeficiency (XSCID). [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00028236>
17. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, James M, Wilson JM (1994) Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genetics* 6: 335-41.
18. Raper SE, Grossman M, Rader DJ, Thoene JG, Clark BJ, Kolansky DM, Muller DW, Wilson JM (1996) Safety and feasibility of liver-directed *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg*, 223: 116-26.
19. Cossu G, Mavilio F (2000) Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: Wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest*, 105: 1669-74.
20. Bachrach E, Li S, Perez AL, Schienda J, Liadaki K, Volinski J, Flint A, Chamberlain J, Kunkel LM (2004) Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3581-6.
21. Middleton PG, Alton EFW (1998) Gene therapy for cystic fibrosis: Which postman, which box? *Thorax* 53: 197-9.
22. Lee TWR, Matthews DA, Blair GE (2005) Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*, 387: 1-15.
23. Vaccination With Autologous Breast Cancer Cells Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in Metastatic Breast Cancer Patients. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00317603>
24. Administration of Autologous DCs Infected with an Adenovirus Expressing Her-2. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00197522;jsessionid=EDB85AB668D33E5A80E6310CFC91558C?order=8>
25. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, Sang-U H, Bakay R, Patel P, Blesch A, H Lee Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Medicine* 11: 551-5.
26. Cortez N, Trejo F, Vergara P, Segovia J (2000) Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a glial-specific promoter elicit behavioral recovery in experimental parkinsonism. *J Neurosci Res*, 59: 39-46.
27. Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C (2007) Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Mediated Prodrug Cancer Gene Therapy. *Cancer Res*, 67: 6304-13.

CAPÍTULO VI

Células madre mesenquimales. ¿Cuál es su futuro en Terapia Génica?

Buenaventura Brito, Susana Olmedillas y Rafael Castro

Como se sabe, las llamadas células madre son células indiferenciadas que, en un proceso de especialización, dan lugar a los diversos tejidos. Estas células se encuentran tanto en los embriones como en individuos adultos, con la doble ventaja de que, en adultos, su uso no sólo no presenta problemas de rechazo al ser células del mismo individuo, sino que, además, eluden todo problema ético, ya que no hay que sacrificar un embrión para obtener sus células.

El interés por las posibles aplicaciones clínicas de las células madre adultas ha aumentado considerablemente en los últimos años. En la médula ósea se han descrito diferentes tipos de células madre: hematopoyéticas (CMH), mesenquimales (CMM), las llamadas *Side Population Cells* (SP) y recientemente las células progenitoras adultas multipotentes (CPAM). Las CMH dan lugar a todos los linajes diferentes de células sanguíneas (mieloide y linfóide), mientras que las CMM generan las células estromales, las cuales pertenecen a los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico, miogénico y fibroblástico. Ambos compartimentos pueden auto-renovarse por proliferación y mantener su fenotipo de célula madre. De estos tipos celulares, son sin duda las células madre mesenquimales (CMM) las que han atraído más la atención de los investigadores.

Propiedades de las células madre mesenquimales

- Presentes en médula ósea y en muchos otros tejidos
- Fácil aislamiento, cultivo y manipulación
- Gran plasticidad y potencial terapéutico
- Reparación y regeneración de múltiples tejidos
- Útiles para Terapia Génica y Terapia Celular
- Expresión de transgenes a largo plazo

Las células madre mesenquimales no hematopoyéticas de la médula ósea, fueron descubiertas por Friedenstein (1), que describió células clonales y plástico-adherentes de la médula ósea, capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (2-4). Estas células son también células estromales, es decir, componentes estructurales de la médula ósea que mantienen el cultivo *ex vivo* de hematopoyesis, al suministrar componentes de la matriz extracelular, como citoquinas y factores de crecimiento (1,5-7). Numerosas investigaciones, han venido a demostrar que pueden obtenerse CMM multipotentes a partir de una amplia variedad de tejidos adultos, y diferenciarse en otra, también amplia variedad de linajes de tejidos, incluyendo, mioblastos, hepatocitos, y posiblemente tejido neural (8-10).

Las CMM constituyen uno de los tipos de células madre más interesantes del estado adulto, ya que estas células pueden ser fácilmente aisladas, cultivadas, y manipuladas *ex vivo*. Además, exhiben una gran plasticidad y potencial para aplicaciones terapéuticas, y al obtenerse de un aspirado de médula ósea de 2 mL pueden ser expandidas 500 veces en casi 3 semanas, reteniendo su multipotencialidad durante al menos 6 a 10 pases. La fuente principal de CMM, en los individuos adultos, es el estroma de la médula ósea. Estudios recientes, sugieren que en humanos hay 1 célula madre mesenquimal por cada 34.000 células nucleadas (11), mientras que en ratón la frecuencia estimada es 1 por 11.300-27.000 células nucleadas (12). El potencial de auto-renovación de las CMM no está establecido definitivamente, pudiendo variar mucho según la metodología empleada y las

especies de los distintos modelos animales. Las células pueden expandirse por, al menos 40 duplicaciones poblacionales (PDs) antes de que su tasa de crecimiento disminuya significativamente, como se ha visto de hecho con CMM humanas (13). La adición de factores de crecimiento puede modificar también estos resultados, por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) que incrementa la esperanza de vida replicativa de las CMM humanas a más de 70 PDs (14), mientras que las CMM murinas muestran, aparentemente, una capacidad de crecimiento *in vitro* ilimitada y sin evidencias de senescencia (12).

Las CMM cultivadas se caracterizan morfológicamente y mediante la identificación de marcadores antigénicos de superficie tales como CD44, CD29 y CD90, para definir CMM humanas (15,16), así como antígenos más específicos, tales como Stro-1, SH2, SH3 y SH4 (17). Sus características fenotípicas indican que poseen antígenos MHC de clase I, pero no de clase II, ni las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 (18).

La médula ósea se ha convertido en un proveedor frecuente de células madre para estudios de Terapia Génica, y cada vez hay más evidencias a favor de que estas células serán muy útiles para este tipo de terapias (18,19-21), especialmente en el campo de la ingeniería de tejidos. También el tejido adiposo ofrece muy buenas posibilidades. El objetivo último es usar las CMM en varias formas de terapia y, también, como herramientas para entender los mecanismos que llevan a la reparación y regeneración de los tejidos y órganos dañados o enfermos, pudiéndose manipular para que secreten una amplia variedad de diferentes proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*, que podrían potencialmente servir para el tratamiento de muchas deficiencias en proteínas séricas, tanto en aquellas enfermedades genéticas como adquiridas.

Transferencia génica en células madre mesenquimales

Las células madre pueden manipularse *ex vivo* y recibir las modificaciones genéticas necesarias para la corrección de una enfermedad, evitándose con ello la necesidad de exponer al paciente directamente a los vectores y en consecuencia a sus efectos adversos fundamentalmente en lo que se refiere a la respuesta inmunológica de rechazo con la posibilidad de choques anafilácticos graves (22) o a la mutagénesis insercional (23). Cuando se emplean células madre proliferativas, como es el caso de las células mesenquimales, existe la posibilidad de seleccionar con éxito los clones alterados para la reperfusión, lo que podría ser suficiente para minimizar los riesgos de mutagénesis insercional. Esta peculiaridad contrasta con el uso de las células madre hematopoyéticas (CMH) las cuales son, en gran parte, no proliferativas *in vitro*.

Hay varias razones por las que las CMH adultas resultan muy prometedoras en sus aplicaciones en la Terapia Celular y la Terapia Génica: a) Pueden obtenerse y expandirse en cultivo fácilmente, así como permitir la expresión de transgenes a largo plazo; b) Disponen de multipotencialidad y de una gran capacidad de auto-renovación; así, se ha observado en numerosos estudios de trasplantes en animales que las CMM, expandidas *ex vivo*, pueden diferenciarse en células del tejido hospedador, reparando el tejido dañado por trauma o enfermedad y, además, restaurar parcialmente su función normal; c) Regeneran no solamente tejidos de linajes mesenquimales, sino que, también, se diferencian en células derivadas de otras capas embrionarias, lo que demuestra la plasticidad de estas células madre adultas y su utilidad en reparación y regeneración de múltiples tejidos; d) Ni las CMM autólogas ni las alogénicas inducen inmuno-reactividad en el hospedador, después de un trasplante local o administración sistémica, convirtiéndolas en células inmuno-privilegiadas y en vectores ideales para transferir genes en tejidos de interés y, por tanto, aplicarlas en Terapia Génica; de hecho, cuando las células autólogas se corrigen genéticamente, adquieren probablemente una ventaja proliferativa sobre las células del paciente, aumentando así, la probabilidad de integrarse en tejidos y permitiendo la expresión continuada del transgén; e) Su transfección *ex vivo* permite una evaluación previa del sitio

de integración del DNA, antes de usar las células, siendo posible manipularlas con mecanismos de apoptosis a prueba de errores.

Vectores retrovirales oncogénicos

Aunque la habilidad de las CMM para auto-renovarse, con una alta tasa de proliferación, pueda llevar a pensar que serían dianas ideales para estrategias de transferencia de transgenes, mediada por retrovirus, hay varios estudios con vectores oncorretrovirales (como el virus de la leucemia murina de Moloney, MoMLV) que han resultado problemáticos. Una limitación importante es la falta general de expresión del transgén a largo plazo, posiblemente debido a la inactivación o silenciamiento de las repeticiones LTRs de esos vectores (18,24). Se han buscado alternativas basadas en el uso de vectores de virus de células madre murinas, puesto que parecen ser menos propensas al silenciamiento transcripcional de la expresión génica viral. Sin embargo, la transducción de las CMM con vectores tanto tipo MoMLV como de virus en células madre murinas parece ser ineficaz (18). Entre otras cosas, es preciso usar marcadores de resistencia para enriquecer las células transducidas, y múltiples rondas de transducción durante varios días o disponer de "stocks" del vector muy concentrados (25,26).

Vectores lentivirales

La situación anterior cambia sustancialmente cuando se emplean vectores lentivirales (VL) basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), porque parecen ser muy eficientes para transferir y expresar transgenes en las CMM (27-29). Una sola ronda de transducción con un VL tipo HIV-1 produjo una transducción eficiente de las CMM humanas y una expresión prolongada del transgén durante al menos 5 meses (27). Además, a diferencia de los vectores oncorretrovirales, los VL pueden transducir eficientemente células que no se dividen (18,30). Esto es importante dado que hasta un 20% de una subpoblación de células progenitoras mesenquimales parece ser quiescente (31). Otro hallazgo interesante fue que se obtenían altas eficacias de transducción cuando se usaban partículas lentivirales pseudotipadas con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Sin embargo, aunque las eficacias de transducción que se obtenían en CMM humanas, empleando VL pseudotipados con la proteína quimérica RD114, eran similares a las conseguidas con VL pseudotipados con VSV-G, los pseudotipos RD114 eran menos tóxicos en ensayos con progenitores de CMM humanas (29). Recientemente, se ha descrito un método de purificación de CMM murinas de médula ósea, y su eficiente transducción mediante VL (32). Las células transducidas retuvieron su capacidad, *in vitro*, para diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos, así como, en células similares a miocitos y astrocitos. También se comprobó que cuando se administraban sistémicamente en ratones singénicos las CMM transducidas se diferenciaban fenotípicamente, adquiriendo la morfología específica de los diferentes tejidos.

Vectores adenovirales y adenoasociados

Con respecto a los vectores adenovirales, son los vectores quiméricos derivados fundamentalmente de un vector adenoviral tipo 5 estándar (Ad5) los que se muestran más efectivos, desde el punto de vista de la transducción y expresión del transgén en las CMM (33,34). Algo parecido ocurre con los vectores adenoasociados (AAV), pues hasta hace relativamente poco tiempo, habían tenido limitadas aplicaciones en CMM debido a sus bajas eficacias de transducción. Pero estas razones se han intentado subsanar al descubrirse recientemente un sistema de transducción, activado por luz ultravioleta, para la transferencia con vectores AAV en CMM humanas (35), así como por la optimización de la transferencia génica mediada por AAV en CMM murinas (36).

Vectores no virales

Las cuestiones de seguridad, asociadas con la transducción viral, han llevado a la búsqueda de métodos alternativos de transferencia génica no viral en CMM.

La transferencia de DNA plasmídico en CMM primarias mediante métodos de transfección tradicionales, tales como precipitación de fosfato cálcico, lipofección y electroporación, han tenido poco éxito porque generalmente producen una eficacia de transfección menor del 1% y una elevada mortalidad celular; por tanto, estos métodos no son adecuados para producir suficiente cantidad de células transfectadas, para transferencia génica y trasplantes. Más esperanzadores resultan los recientes métodos no virales de lipofección en presencia de ligando (transferrinfección) que detalladamente se describen en el capítulo III de este libro.

Recientemente, se han desarrollado dos nuevos métodos que permiten transfectar CMM primarias, a saber, la nucleofección y la vibración molecular inducida por campo eléctrico. La nucleofección (que combina la electroporación y una solución específica de transfección) introdujo satisfactoriamente un plásmido marcador que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en CMM primarias, con una eficacia de transfección de hasta un 80% y un 50% de viabilidad celular, y sin inducir efectos adversos aparentes en la función celular normal (37). Además, cuando se usó nucleofección para transfectar CMM con un plásmido con el gen de GFP, bajo el control de un promotor específico de linaje, como el de la osteocalcina, dichas células adquirieron un fenotipo de osteoblasto en función del tiempo de inducción y mantuvieron su capacidad de transdiferenciación multilínea. La vibración molecular inducida por campo eléctrico ("*Gene Symphonizer*") es un método no invasivo que permite introducir DNA exógeno en líneas celulares establecidas, tales como las células C3H10T1/2 murinas o las células primarias (incluyendo condrocitos, células mesenquimales embrionarias, y CMM) con alta eficacia de transfección (20-80%) y baja mortalidad celular (38). Otra característica importante de este método es su habilidad para transferir, también, DNA exógeno en tejidos multicapa, como cartílago de esternón y músculo esquelético. Como tal, podría ser aplicado para transferir DNA exógeno directamente en tejidos u órganos diana *in vivo*. También se han empleado con éxito, en CMM humanas, métodos de transfección basados en liposomas, para introducir transgenes y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) (39) e, incluso, cromosomas artificiales de mamíferos (40).

Aplicación de las células madre mesenquimales en Terapia Génica para enfermedades congénitas y adquiridas

Las CMM pueden aplicarse directamente en un amplio rango de modelos animales de enfermedad, donde pueden actuar como agentes terapéuticos *per se* o como vehículos de transferencia de genes terapéuticos (**Figura 1**).

Enfermedades neurológicas

De la afirmación de que "*las enfermedades neurodegenerativas son incurables porque las neuronas adultas no se regeneran*", se ha evolucionado hasta una visión más flexible, al encontrarse numerosas evidencias de que el cerebro maduro es capaz de regenerar neuronas. Ante el carácter crónico y progresivo que representan las enfermedades neurodegenerativas caben, fundamentalmente, dos estrategias terapéuticas: una estrategia neuroprotectora, cuyo objetivo principal va encaminado a enlentecer el ulterior proceso degenerativo de las neuronas supervivientes, y otra neurorreparadora, enfocada más hacia la restitución de las neuronas perdidas.

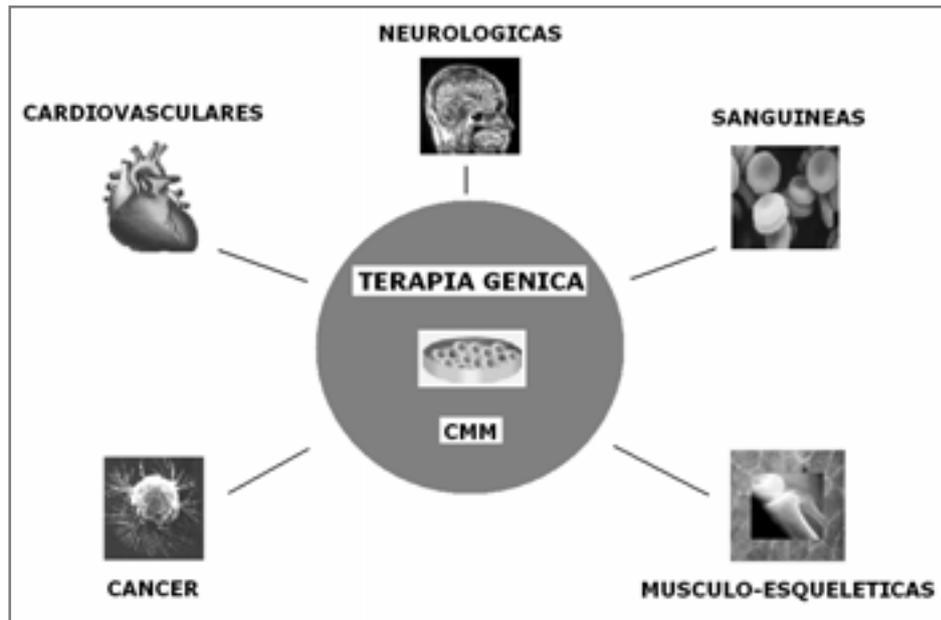


Figura 1. Las células madre mesenquimales como vehículos de transferencia de genes terapéuticos para diversas enfermedades.

Las CMM, genéticamente modificadas, constituyen plataformas atractivas para la producción continua de proteínas terapéuticas *in vivo*. En este sentido, se han realizado importantes progresos en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (41), y enfermedades de almacenamiento lisosomal, entre las que se incluye la enfermedad de Tay-Sachs (42), los tipos A y B de la enfermedad de Niemann-Pick (43,44) y la mucopolisacaridosis tipo VII (45).

Recientemente, se ha descrito que las CMM pueden mejorar las deficiencias funcionales que se producen, después de inducir una isquemia cerebral, en ratas (46). Se manipularon CMM con vectores adenovirales que expresaban el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), con objeto de promover la recuperación funcional y reducir el área cerebral infartada, en un modelo en rata de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media. El análisis de imagen de resonancia reveló que las ratas del grupo CMM-BDNF tuvieron una mayor recuperación de la isquemia, comparado con los animales que recibieron CMM no modificadas.

La aplicación de las nuevas tecnologías ha permitido investigar, también, la capacidad de diferenciación de las CMM adultas, aplicando varios protocolos de cultivo y examinando su potencial terapéutico (**Figura 2**). Se han logrado diferenciar CMM adultas humanas en células neurales, modificando las decisiones sobre el destino celular. Así, mediante un protocolo de transferencia génica en CMM de rata y humanas, con secuencias correspondientes al dominio intracelular del gen *Notch* (NICD) y el tratamiento posterior con factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), forskolina y factor neurotrófico ciliar (CNTF), se ha logrado una inducción, altamente eficaz y específica, de células con características neuronales (sin diferenciación glial) (47).

Las CMM diferenciadas expresaban nestina (un marcador de células progenitoras neurales) y cuando estas células, con características neuronales, eran tratadas con factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, un factor neurotrófico de las neuronas dopaminérgicas), aumentaba la proporción de células que expresan tirosina hidroxilasa (TH) —enzima limitante de la síntesis de catecolaminas—, y de células productoras de dopamina. Además, el trasplante intra-estriatal, de las células tratadas con GDNF, mejoró la conducta asimétrica rotacional inducida por apomorfina —un agonista de receptores dopaminérgicos—, en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson inducido con la

neurotoxina 6-hidroxidopamina. Estos resultados indican que pueden generarse células neuronales funcionales y específicas a partir de las CMM.

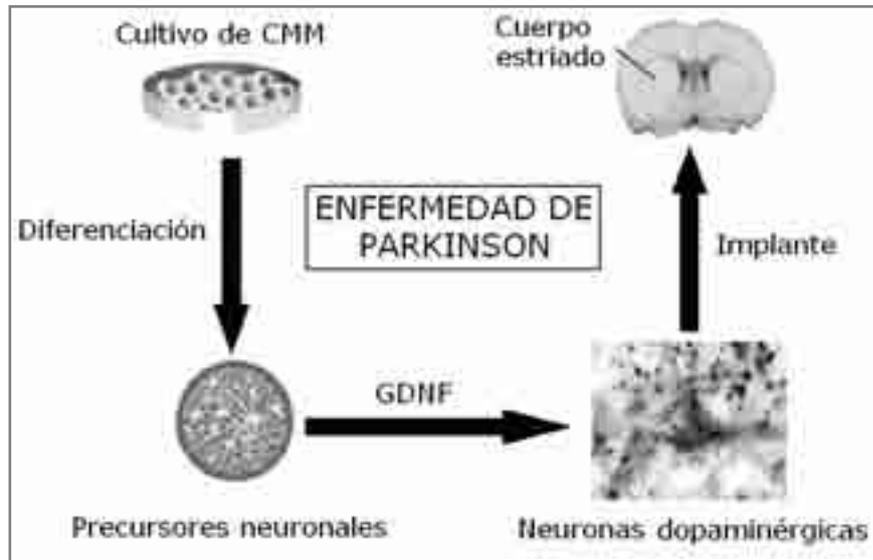


Figura 2. Protocolo de Terapia Génica *ex vivo* con células madre mesenquimales en un modelo animal de Enfermedad de Parkinson.

Enfermedades hematológicas

Las CMM de médula ósea son células muy atractivas para la Terapia Génica de enfermedades congénitas. Por ejemplo, se están utilizando para la hemofilia (48,49) o para la deficiencia de eritropoyetina (50). Con relación a la eritropoyetina, las CMM transducidas con el gen de la eritropoyetina humana (hEPO), se introducían en dispositivos de inmunoisolamiento que, posteriormente, eran quirúrgicamente implantados en mandriles hospedadores autólogos o alogénicos. Con este sistema podían detectarse niveles séricos de hEPO hasta 137 días después de la operación, así como un aumento significativo del hematocrito. Sin embargo, en los experimentos en los que las CMM transducidas fueron inyectadas intramuscularmente en ratones NOD/SCID, los niveles séricos de hEPO podían detectarse hasta sólo 28 días después de la intervención (50). En la misma línea, se ha estudiado si las CMM de ratón, genéticamente modificadas, incorporadas en un material viscoso de colágeno bovino tipo I, podían servir, a modo de implante recuperable, para la administración sistémica de mEPO. Los resultados mostraron que los ratones C57Bl/6, implantados subcutáneamente con CMM que habían sido retroviralmente transducidas para expresar mEPO y embebidas en colágeno viscoso, tenían un hematocrito superior al 70%, que se mantenía hasta 203 días después del implante (51). En los ratones carentes de dicha matriz-soporte se obtenían valores de hematocrito de la misma magnitud, mucho menos estables en el tiempo, y que retornaban a los niveles basales a los 60 días. La remoción quirúrgica de la matriz de colágeno, 24 días después de la implantación, condujo a una reducción rápida del hematocrito hasta los niveles basales. Esta investigación demuestra que las CMM embebidas en una matriz de colágeno viscoso, humanamente compatible, ofrecen una buena alternativa, duradera y reversible para la administración de proteínas terapéuticas.

En resultados recientes utilizando CMM de la médula ósea humana, se ha comparado el potencial de transducción de vectores lentivirales autoinactivantes (vectores VL-SIN) y vectores oncorretrovirales que expresan la GFP bajo el control de un promotor interno de citomegalovirus (CMV) (52). Los resultados mostraban que el porcentaje de células GFP⁺ era consistentemente mayor cuando se empleaban VL, hallazgo corroborado tanto con un aumento en los niveles de mRNA de GFP como con un incremento en la eficacia de la transferencia génica, medida por PCR y "southern". Los niveles de expresión *in vitro* tanto

de GFP como de Factor VIII que también se utilizaba como transgén, permanecieron estables hasta varios meses después de la transducción, aunque la expresión fue declinando lentamente. Además, las células transducidas retenían sus propiedades de células madre progenitoras, ya que eran aún capaces de diferenciarse, *in vitro*, en linajes de células adipogénicas y osteogénicas, y mantenían niveles elevados de expresión del transgén (52). Por otro lado, cuando se usaban puentes de colágeno, para la implantación de las CMM humanas, transducidas con lentivirus, en ratones inmunodeficientes, se lograba una eficaz incorporación *in vivo*, de las células genéticamente manipuladas, así como una expresión duradera del transgén. Por tanto, estos implantes mesenquimales, biocompatibles de médula ósea, representan una estrategia de transferencia de proteínas, reversible, segura y versátil, porque pueden recuperarse en el caso de una reacción adversa inesperada o cuando ya no es necesario que siga expresándose la proteína de interés.

Hay interesantes trabajos en los que se demuestra la capacidad de las CMM humanas para expresar de forma continua proteínas terapéuticas de utilidad clínica, actuando así como vectores celulares de transferencia génica sistémica. Por ejemplo, las CMM humanas han sido transducidas con un vector oncorretroviral —el virus del sarcoma mieloproliferativo— que expresa la interleuquina 3 humana (hIL-3). Las células así transducidas, implantadas en ratones con una inmunodeficiencia severa (SCID), eran capaces de formar tejido óseo, secretando niveles detectables de hIL-3 en la circulación sistémica, durante al menos 12 semanas (25). Además, las CMM transducidas podían diferenciarse en linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos, manteniendo la expresión del transgén después de su diferenciación (53). Estudios paralelos se llevan a cabo, *in vivo*, con ratones NOD/SCID. Al cultivar en diferentes matrices CMM humanas que expresaban hIL-3, e inyectar las mismas por vía subcutánea, intravenosa e intraperitoneal, se encontraban niveles de expresión sistémica de hIL-3, mantenidos en el rango de 100-800 pg/mL, durante un periodo de 3 meses.

Enfermedades cardiovasculares

El uso de células madre progenitoras, en el tratamiento de varias anomalías que precipitan la enfermedad cardiovascular, tiene un enorme potencial. Hay evidencias —cada vez más— a favor del empleo de las CMM para regenerar el miocardio y los vasos sanguíneos (54). Cuando estas células son expandidas, *ex vivo*, expresan marcadores para células miocárdicas y endoteliales (55,56). Hay una serie de hallazgos experimentales que han supuesto un avance espectacular en la Terapia Celular dirigida a la regeneración del miocardio, por ejemplo, el aislamiento de una línea celular cardiomiogénica murina (CMG) a partir de CMM de médula ósea de ratón (57). También han sido cruciales otros descubrimientos como el efecto diferenciador, en CMM humanas, de moléculas como la 5-azacitidina, y de factores de adhesión, para inducir, *in vitro*, células con características comúnmente atribuidas a cardiomiocitos (58,59); que las CMM humanas, inyectadas directamente en el miocardio de ratón, pueden diferenciarse hasta cardiomiocitos, los cuales expresan diversos marcadores cardíacos en niveles comparables a aquellos de los cardiomiocitos del hospedador (60), y el logro de la estimulación de la angiogénesis y miogénesis, en modelos animales con infarto agudo de miocardio (61).

Trabajos recientes, realizados con clones de CMM que responden a 5-azacitidina (*CD34^{bajo}/ckit⁺CD140a⁺Sca-1^{alto}*) y son transducidos con un vector que expresa GFP, han llevado a la conclusión de que el tipo celular más involucrado en la regeneración cardíaca es el de las CMM, posiblemente, debido más a sus efectos arteriogénicos que a sus propiedades cardiomiogénicas (21,62). Aunque se ha visto que el trasplante de las CMM representa una estrategia interesante para la reparación cardíaca, tras un daño en el miocardio, la capacidad reparadora de dichas células, *in vivo*, es limitada debido a la pobre viabilidad celular asociada con dicho trasplante. Recientemente, se ha estudiado la transducción retroviral, *ex vivo*, en CMM de rata, para sobreexpresar el gen *Akt1* de pro-supervivencia (63). El trasplante de estas células, en el miocardio isquémico, redujo la inflamación intramiocárdica, la deposición de colágeno y la hipertrofia de miocitos cardíacos, y regeneró,

casi totalmente, el volumen miocárdial perdido. Además, se normalizó, completamente, la función cardíaca tanto sistólica como diastólica.

Los marcapasos cardíacos electrónicos se han convertido en una importante herramienta terapéutica para el tratamiento de pacientes con bloqueo cardíaco y disfunción del nodo sino-atrial, que es el marcapasos biológico primario del corazón. Se han realizado experimentos de Terapia Génica *ex vivo* para comprobar si las CMM humanas pueden servir de plataforma para llevar el “gen marcapasos” *mHCN2* al corazón (64). Los resultados obtenidos mostraron que las CMM humanas pueden ser eficientemente transfectadas, por electroporación, con un vector que dirige la expresión del gen *HCN2* de ratón (*mHCN2*) y de la GFP. Estas células expresaban, *in vitro*, canales *mHCN2* funcionales; además, cuando las células transfectadas con el “gen marcapasos” eran inyectadas *in situ*, en el subepicardio de la pared del ventrículo izquierdo canino, expresaban canales *HCN2* funcionales que mimetizaban la sobre-expresión de genes *HCN2* en miocitos cardíacos (64). Por otro lado, las CMM humanas podían sintetizar conexinas y establecer uniones *gap* funcionales que se acoplaban, eléctricamente, con los miocitos cardíacos caninos. Estos hallazgos sugieren que las CMM humanas pueden servir, como alternativa, para la transferencia de estos “genes marcapasos”.

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) constituye una atractiva diana para Terapia Génica cardiovascular. Por ejemplo, se ha realizado la transferencia del gen de la eNOS, mediada por vectores adenovirales (Ad5), en CMM de rata expandidas *ex vivo* (65). La inyección intra-cavernosa de las CMM así transducidas incrementó la expresión de la proteína eNOS en el cuerpo cavernoso, indicando, una vez más, el potencial clínico de dichas células para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Enfermedades músculo-esqueléticas

Para el tratamiento de una gran variedad de defectos músculo-esqueléticos se han empleado vectores virales que expresan, fundamentalmente, las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-4. Cuando se utilizaban vectores adenovirales estándar, codificando BMP-2 para transducir células progenitoras de CMM, se observaba una proliferación y diferenciación *in vitro* de tales células, así como la formación *in vivo* de hueso (66). Hay resultados, también, con vectores adenovirales quiméricos, que contienen un adenovirus, tipo fibra-35 (Ad5F35), y que expresan BMP-2 humana (33). Así, las CMM humanas transducidas sirvieron para un ensayo *in vivo*, heterotópico, de formación de hueso. El hueso mineralizado fue identificado, radiológicamente, en tejido muscular implantado con CMM humanas transducidas con Ad5F35 (33). Otro avance, muy importante, ha sido comparar la capacidad de diferentes tipos celulares humanos —con potenciales osteogénicos claramente diferentes, incluyendo a las CMM— para inducir formación heterotópica de hueso, después de una transducción *ex vivo* con dos vectores adenovirales diferentes que expresan BMP-2 (67). En todos los tipos celulares estudiados, el Ad5F35-BMP-2 fue más eficaz que el Ad5-BMP-2, ya que generaba niveles adecuados de BMP-2, para lograr una correcta osteoinducción. También, se ha realizado un estudio comparativo entre vectores adenovirales con una mutación, en la base de la fibra (Ad/RGD), y vectores adenovirales no mutados, en CMM transducidas con múltiples similares de infección (MOI). Los resultados obtenidos mostraban que las CMM transducidas con vectores Ad/RGD producían cantidades mayores de BMP-2 que las células infectadas con vectores adenovirales control y, que también, se diferenciaban *in vitro* más eficientemente hacia un linaje osteogénico (34). Además, tras la transducción génica *ex vivo*, se valoró el potencial para la formación ectópica de hueso, *in vivo*, por las CMM transducidas. Las CMM transducidas con vectores Ad/RGD, exhibieron una formación considerable de hueso nuevo, cuando se comparó con las transducidas con vectores control. Estos datos sugieren que los vectores Ad/RGD constituyen importantes herramientas para Terapia Génica en la regeneración ósea.

También se ha evaluado la modificación genética *ex vivo* de CMM de rata con diferentes vectores (adenovirales, retrovirales y lípidos catiónicos) que expresan BMP-2 humana (68).

Sólo las CMM que habían sido transducidas *in vitro* con vectores adenovirales produjeron niveles detectables de BMP-2, encontrándose un aumento significativo en la actividad fosfatasa alcalina endógena que es un índice de diferenciación osteogénica. Además, se estudió la capacidad de las CMM, genéticamente modificadas con vectores adenovirales, para facilitar la formación *in vivo* de hueso, después de cultivarlas sobre una matriz de titanio. Para ello, se creó un defecto, de tamaño-crítico ortotópico, y se observó la formación de hueso en diferentes condiciones. Los resultados indicaron un pequeño, pero significativo, incremento en la formación de hueso, con relación a las CMM que habían sido transducidas con vectores control. Los implantes que estaban en una localización ectópica indujeron una mínima formación ósea, con respecto a la localización ortotópica, resultando menos efectivas en la formación de hueso, las CMM transducidas con vectores basados en lípidos catiónicos que las tratadas con vectores virales.

Otros muchos trabajos han demostrado, en este mismo sentido, resultados muy esperanzadores utilizando, por ejemplo, polímeros para inducir regeneración ósea (69) o vectores oncorretrovirales (70,71) y adenoasociados (72).

Cáncer

La Terapia Génica del cáncer es, en la actualidad, sin lugar a dudas, el campo más prometedor y clínicamente más activo. Aunque los ensayos previos experimentales y clínicos han aportado algunos resultados excitantes, los beneficios clínicos, en general, son aún limitados. Dado que el factor de seguridad es un prerrequisito para la diseminación de vectores, es realmente crucial poder encontrar una Terapia Génica que pueda ser dirigida, específicamente, a las células tumorales. Al hilo de esto, cabe comentar que las CMM han sido, también, "explotadas" para transferir genes con capacidad de expresar agentes biológicos que frenan el crecimiento tumoral.

Aunque el interferón beta (IFN- β) puede inhibir *in vitro* el crecimiento celular maligno, su utilidad terapéutica *in vivo* es limitada, debido a su excesiva toxicidad cuando es administrado, sistémicamente, a altas dosis. Sin embargo, esos efectos tóxicos pueden reducirse empleando CMM humanas transducidas con un vector adenoviral que expresa IFN- β humano (73). En este sentido, se utilizó un modelo de xenotransplante de ratón SCID para examinar los efectos de las células inyectadas (CMM-IFN- β) y del IFN- β recombinante humano, sobre el crecimiento y supervivencia *in vivo* de las células de carcinoma de mama MDA-MB-231 y de las células de melanoma A375SM. El co-cultivo de células CMM-IFN- β con células A375SM o MDA-MB-231 inhibió el crecimiento de células tumorales, al compararlo con el crecimiento de células tumorales cultivadas, sin estar expuestas a las CMM. Además, la inyección intravenosa de CMM-IFN- β en ratones que desarrollaron metástasis pulmonares de células MDA-MB-231 o A375SM, condujo a la incorporación de las CMM en el tumor, lo que se tradujo, además, en una mayor supervivencia de los ratones así tratados respecto a los controles. En contraste, la inyección intravenosa de IFN- β recombinante fue incapaz de prolongar la supervivencia en los mismos modelos utilizados. Es probable que el mecanismo por el que las CMM-IFN- β suprimen el crecimiento de metástasis pulmonares, sea la producción local de IFN- β en el microambiente del tumor. Por tanto, las CMM parecen constituir plataformas efectivas para la transferencia dirigida de proteínas terapéuticas a lugares con neoplasia.

Otro enfoque utilizado, para inhibir el crecimiento tumoral, se basa en la potenciación de la respuesta inmune. Algunos autores han investigado si las CMM genéticamente modificadas, con capacidad para liberar interleuquina 2 (IL-2), pueden inducir una respuesta inmune más efectiva contra células de melanoma B16, pobremente inmunogénicas (74). Al mezclar CMM que producían IL-2 (CMM-IL-2) con células B16, se produjo un retraso significativo, dosis IL-2 dependiente, en el crecimiento tumoral. Además, la colocación de CMM-IL-2 en una matriz próxima a la región tumoral B16, llevó a una ausencia del crecimiento tumoral, en un 90% de los ratones tratados. Trabajos similares han empleado CMM, genéticamente modificadas, para inhibir neoplasmas cerebrales malignos (75). Así, cuando se inoculaban

CMM transducidas con un vector adenoviral que expresa IL-2, en el hemisferio contralateral, éstas eran capaces de migrar hacia las células de glioma 9L, a través del cuerpo caloso. Además, la inyección intra-tumoral de CMM causó una inhibición del crecimiento tumoral, a la vez que aumentó la supervivencia de las ratas con glioma 9L. Por tanto, la Terapia Génica que emplea CMM, como vehículos direccionales, puede representar una nueva y atractiva aproximación terapéutica para los gliomas que son refractarios al tratamiento.

Las CMM pueden promover la expresión de genes suicidas y mantener la replicación de vectores adenovirales oncolíticos, para ser usados como potenciales agentes anticancerosos (76). Por ejemplo, la transducción de CMM con vectores adenovirales tipo Ad-RGD —que incorporan sitios de unión a integrinas—, son mucho más eficaces y, cuando en esas células se hace expresar la timidina quinasa, son capaces de mostrar, *in vitro*, un efecto letal en la línea de carcinoma de ovario humano SKOV3ip1, tras el tratamiento con ganciclovir.

El papel de la resistencia multi-fármaco (MDR) constituye un serio problema en el tratamiento del cáncer con fármacos quimioterápicos. Por tanto, los distintos enfoques de Terapia Génica, dirigidos a disminuir la expresión de tales transportadores —expulsadores de fármacos— en células tumorales, pueden incrementar la eficacia terapéutica de estos fármacos. En este sentido, se ha empleado MDR-1 murino, como antígeno diana para la inmunoterapia del cáncer (77). La administración oral de una vacuna de DNA que expresa MDR-1, transportada por cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* hacia órganos linfoides secundarios, indujo un bloqueo de la tolerancia de las células T periféricas. Los ratones así inmunizados, tres veces a intervalos de dos semanas y tratados dos semanas después con células de carcinomas de colon CT-26 o de pulmón que expresan MDR-1, mostraron un aumento significativo en su esperanza de vida. Por tanto, el empleo conjunto de CMM genéticamente modificadas, que expresan MDR-1 y antígenos específicos tumorales, puede convertirse en una estrategia efectiva antitumoral.

Reprogramación de células diferenciadas para obtener células madre

En noviembre de 2007 un equipo de investigación japonés y otro estadounidense publicaron simultáneamente y de manera independiente sendos artículos acerca de la obtención de células madre, denominadas células madre pluripotenciales inducidas o iPS (por sus siglas en inglés), a partir de células diferenciadas humanas (78,79). Las células iPS se caracterizan por presentar la misma morfología, capacidad de proliferación, patrones de expresión génica, expresión de marcadores de superficie y capacidad de formación de teratomas que las células madre embrionarias, haciéndolas prácticamente indistinguibles. Estas propiedades hacen de las células iPS una posible alternativa al uso de las células madre embrionarias humanas (hES), eliminando así el problema ético de la utilización de embriones como fuente celular y la posibilidad de rechazo al injerto.

Estos estudios partieron de las conclusiones extraídas en un trabajo anterior del grupo japonés, liderado por Takahashi y Yamanaka, quienes en 2006 obtuvieron células iPS a partir de fibroblastos embrionarios de ratón. Para llevar a cabo dicha reprogramación, introdujeron en las células diferenciadas, mediante un vector retroviral, los genes de cuatro factores de transcripción: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, relacionados con el mantenimiento y la inducción del estado de pluripotencia en las células madre embrionarias. De este modo lograron obtener clones de células iPS (80).

El siguiente paso fue la reprogramación de fibroblastos de dermis humana, que permitió obtener clones de células iPS con una morfología similar a las colonias de células madre embrionarias humanas, con células de núcleo grande y citoplasma escaso. Al igual que ocurre con las hES, a veces aparece una zona de diferenciación espontánea en el centro de la colonia. Otra similitud entre ambos tipos de células reside en su dependencia de la monocapa de alimentación para crecer.

Las células iPS analizadas mostraban también los mismos marcadores antigénicos de superficie que las células hES: negativas para SSEA-1 y positivas para SSEA-3 y 4, (TRA)-1-60, TRA-1-81, fosfatasa alcalina y la proteína NANOG. El análisis por RT-PCR de los clones de células iPS reveló la expresión en niveles equivalentes o superiores de los mismos genes marcadores que las células madre embrionarias humanas, y que éstos no se expresaban en los fibroblastos de dermis humana. Los niveles de proteínas analizados por "Western-Blot" de Oct3/4, Sox2, Nanog, Sall4, E-Cadherin y hTert también eran similares en las células iPS y en las células hES.

Por otra parte, los análisis de microarrays de DNA mostraron patrones de expresión génica global similares, aunque no idénticos, entre células iPS y células madre embrionarias humanas. Las regiones promotoras de los genes asociados a la pluripotencia estaban metiladas en los fibroblastos de la dermis y no metiladas en las células iPS y células madre embrionarias humanas, indicando que estaban activos en estas células. Además, las células iPS presentaban estados modificados de las histonas característicos de las hES y una actividad telomerasa elevada, relacionada con la pluripotencia.

La proliferación de las células iPS es exponencial durante, al menos, 4 meses y los tiempos de duplicación son equivalentes a los de células hES. Son capaces de formar cuerpos embrioides en cultivo en suspensión y pueden diferenciarse en tejidos de las tres hojas embrionarias *in vitro*. Para comprobar la inducción del estado de pluripotencia *in vivo*, clones de células iPS se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos, observando la aparición de teratomas constituidos por tejidos procedentes de endodermo, mesodermo y ectodermo. Los investigadores de este grupo también sometieron a las células iPS a condiciones de diferenciación *in vitro*, logrando obtener células neuronales y cardiomiocitos.

Cabe destacar que los genes introducidos se encontraban silenciados en las células iPS, por lo que se concluye que la reprogramación no depende de la expresión continua de los transgenes. Los autores proponen que Oct3/4 y Sox2 activan de forma sinérgica genes asociados a pluripotencia y suprimen genes asociados a la diferenciación en células madre embrionarias humanas y de ratón. Sin embargo, estos factores de transcripción no se pueden unir a sus genes diana en las células diferenciadas debido a la existencia de otros mecanismos inhibidores, como la metilación del DNA y ciertas modificaciones de las histonas. Por eso, los autores suponen que la función de c-Myc y Klf-4 sería la de modificar la estructura de la cromatina para que Oct3/4 y Sox2 puedan unirse a sus genes diana.

Sin embargo, se ha visto que la expresión forzada de c-Myc induce apoptosis y diferenciación en células hES, por lo que es probable que c-Myc contribuya al inicio de la reprogramación pero no al mantenimiento de la pluripotencia. Teniendo en cuenta, además, que cada clon tiene más de 20 sitios de integración retroviral y que, cerca del 20% de los ratones derivados de células iPS desarrolló tumores atribuibles al menos en parte a la reactivación de c-Myc, el riesgo de tumorigénesis es elevado (78).

Por todo ello, el equipo de investigación estadounidense liderado por Thomson, desarrolló sus experimentos de reprogramación en ausencia de c-Myc. Utilizaron una línea celular diferenciada distinta: IMR90 (fibroblastos fetales humanos) y en este caso el vector era lentiviral. Los genes transfectados fueron: Oct 3/4, Sox2, Nanog y Lin28. Después de obtener clones de células iPS, realizaron estudios de morfología, microarrays de DNA, RT-PCR, formación de teratomas, histología, etc., igual que habían hecho los investigadores japoneses, comparando los resultados con células madre embrionarias humanas y llegaron a los mismos resultados. Y además concluyeron que el factor Lin28, a pesar de influir en la frecuencia de reprogramación, no es absolutamente imprescindible para que este proceso tenga lugar (79).

En enero de 2008, el grupo de Takahashi y Yamanaka ha publicado un estudio en el que obtienen células iPS humanas y de ratón sin utilizar c-Myc, que era uno de los principales

inconvenientes encontrados a sus experimentos hasta el momento. Llevaron a cabo la transfección con sólo 3 de los factores, es decir, sin c-Myc, y además comprobaron que hay otros factores de transcripción de las mismas familias que también pueden inducir la reprogramación de las células a iPS. Llegaron a la conclusión de que el proceso de reprogramación es más lento y menos eficiente cuando se lleva a cabo sin c-Myc, pero que la inducción es más específica y aparecen menos colonias de fondo. Observaron que los marcadores génicos expresados por las células iPS coincidían con los de las células madre embrionarias, así como en sus niveles. Además, al inyectar estos clones en blastocistos lograron obtener quimeras vivas, en las que el riesgo de tumorigenicidad se redujo considerablemente. Y comparando sus resultados con los del grupo estadounidense, se puede especular con la posibilidad de que tanto Oct 3/4, Sox2 y Klf4 como Lin28 puedan reclutar las proteínas Myc endógenas y activar su producción para llevar a cabo el proceso de reprogramación (81).

En definitiva y a pesar de que aún quedan muchas cuestiones por resolver respecto a la bioseguridad de las células iPS antes de aplicarlas en terapias humanas, especialmente teniendo en cuenta que son necesarios vectores virales para su obtención, lo que sí se ha puesto de manifiesto es que las células iPS constituyen una herramienta muy útil como modelo para comprender el mecanismo de desarrollo de ciertas patologías y para la búsqueda de fármacos y el estudio de su toxicidad.

El futuro de las células madre mesenquimales en Terapia Génica

Puesto que las CMM son multipotentes y pueden expandirse fácilmente en cultivo, hay mucho interés en su potencial clínico para la reparación de tejidos y para Terapia Génica. Como resultado de ello, se han realizado numerosos estudios, tanto en modelos animales como en ensayos clínicos, que demuestran la migración y el potencial de injerto multi-órgano de las CMM. Estas células son las células madre más prometedoras, como diana potencial para uso clínico.

Sin embargo, la mayoría del conocimiento de las CMM que se ha generado hasta la fecha, concierne a su comportamiento *in vitro*, ya que se conoce poco sobre sus peculiaridades *in vivo*. Aunque esto no impide su aplicación para el tratamiento de enfermedades o para la reposición de tejidos dañados, está claro que se requiere un mayor entendimiento de su biología, con objeto de alcanzar máximos beneficios. Son necesarios más estudios para conocer la biología de las CMM frescas o no manipuladas, frente a las expandidas, y su interacción con los micro-ambientes tisulares. La tarea no será fácil, porque, en la actualidad, el seguimiento de los destinos de las CMM manipuladas *ex vivo*, después de su administración sistémica, en modelos animales, puede conducir a resultados sesgados. Además, la falta de marcadores definitivos no permite la observación directa de las CMM *in vivo* por lo que es obligada su previa caracterización *in vitro* antes de emplearse.

Se necesitan nuevas estrategias que permitan el aislamiento de CMM y su manipulación genética, sin interferir con los procesos de auto-renovación y diferenciación, con objeto de garantizar tanto una implantación en tejidos duradera como efectos terapéuticos a largo plazo de estas CMM genéticamente modificadas. Pero parece claro que las células madre adultas y particularmente las CMM humanas, serán herramientas poderosas para la medicina regenerativa y la Terapia Génica. Un mejor entendimiento de sus propiedades peculiares, podrá aportar nuevas ideas para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para una amplia variedad de enfermedades.

Referencias

1. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation 17: 331-40.

2. Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kalugina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-74.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7.
4. Sekiya I, Vuorio JT, Larson BL, Prockop DJ (2002) *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells: bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4397-402.
5. Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R (1998) Role of members of the *wnt* gene family in human hematopoiesis. *Blood* 92: 3189-202.
6. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R (2003) *Wnt* proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448-52.
7. Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ (2003) *Wnt* signalling inhibitor Dkk-1 is required for re-entry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow stroma (hMSCs). *J Biol Chem*, 278: 28067-78.
8. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol*, 30: 896-904.
9. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-GonzalezXR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-9.
10. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM (2003) Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(Suppl 1): 11854-60.
11. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 121: 368-74.
12. Meirelles Lda S, Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol*, 123: 702-11.
13. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 64: 278-94.
14. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2003) *Ex vivo* enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*, 287: 98-105.
15. Otto WR, Rao J (2004) Tomorrow's skeleton staff: Mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*, 37: 97-110.
16. Deans RJ, Moseley AB (2000) Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28: 875-84.
17. Barry FP, Murphy JM (2004) Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 568-84.
18. Reiser J, Zhang X-Y, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF (2005) Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 5: 1571-84.
19. Baksh D, Song L, Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8: 301-16.
20. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL (2005) Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res*, 306: 330-5
21. Meirelles Lda S, Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol*, 123: 702-11.
22. Kaiser J (2004) Gene therapy. Side effects sideline hemophilia trial. *Science* 304: 1423-5.
23. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulfraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348: 255-6.
24. Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, Goovaerts I, Vanslembrouck V, Collen D, Vandendriessche T (2000) Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with Factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human Factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*, 11: 729-38.
25. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL (1997) LacZ and interleukin-3 expression *in vivo* after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther*, 8: 1417-27.
26. Chuah MK, Brems H, Vanslembrouck V, Collen D, Vandendriessche T (1998) Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther*, 9: 353-65.
27. Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J (2002) Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol Ther*, 5: 555-65.
28. Lee CI, Kohn DB, Ekert JE, Tarantal AF (2004) Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Ther*, 9: 112-23.
29. Zhang XY, La Russa VF, Reiser J (2004) Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *J Virol*, 78: 1219-29.
30. Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol*, 72: 8873-83.
31. Conget PA, Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol*, 181: 67-73.
32. Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D (2004) *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci*, 117: 5655-64.
33. Olmsted-Davis EA, Gugala Z, Gannon FH, Yotnda P, McAlhany RE, Lindsey RW, Davis AR (2002) Use of a chimeric adenovirus vector enhances BMP2 production and bone formation. *Hum Gene Ther*, 13: 1337-47.

34. Tsuda H, Wada T, Ito Y, Uchida H, Dehari H, Nakamura K, Sasaki K, Kobune M, Yamashita T, Hamada H (2003) Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol Ther*, 7: 354-65.
35. Ito H, Goater JJ, Tiyyapatanaputi P, Rubery PT, O'keefe RJ, Schwarz EM (2004) Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem cells. *Gene Ther*, 11: 34-41.
36. Kumar S, Mahendra G, Nagy TR, Ponnazhagan S (2004) Osteogenic differentiation of recombinant adeno-associated virus 2-transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for *ex vivo* osteoporosis gene therapy. *Hum Gene Ther*, 15: 1197-206.
37. Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olse D, Hall DJ, Tuan RS (2005) Optimization of high efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Mol Biotechnol*, 30: 9-20.
38. Song L, Chau L, Sakamoto Y, Nakashima J, Koide M, Tuan RS (2004) Electric field-induced molecular vibration for non-invasive, high-efficiency DNA transfection. *Mol Ther*, 9: 607-16.
39. Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gulkan H, Bocker W, Schieker M, Jochum M, Neth P (2005) Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 7: 718-28.
40. Vanderbyl S, MacDonald GN, Sidhu S, Gung L, Telenius A, Perez C, Perkins E (2004) Transfer and stable transgene expression of a mammalian artificial chromosome into bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 324-33.
41. Dezawa M, Hoshino M, Ide C (2005) Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. *Expert Opin Biol Ther*, 5: 427-35.
42. Martino S, Cavalieri C, Emiliani C, Dolcetta D, Cusella De Angelis MG, Chigorno V, Severini GM, Sandhoff K, Bordignon C, Sonnino S, Orlicchio A (2002) Restoration of the GM2 ganglioside metabolism in bone marrow-derived stromal cells from Tay-Sachs disease animal model. *Neurochem Res*, 27: 793-800.
43. Jin HK, Carter JE, Huntley GW, Schuchman EH (2002) Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest*, 109: 1183-91.
44. Jin HK, Schuchman EH (2003) *Ex vivo* gene therapy using bone marrow-derived cells: Combined effects of intracerebral and intravenous transplantation in a mouse model of Niemann-Pick disease. *Mol Ther*, 8: 876-85.
45. Sakurai K, Iizuka S, Shen JS, Meng XL, Mori T, Umezawa A, Ohashi T, Eto Y (2004) Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Ther*, 11: 1475-81.
46. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H (2004) BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*, 9: 189-97.
47. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Susuki Y, Ide C (2004) Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 113: 1701-10.
48. Van Damme A, Chuah MK, Dell'Accio F, De Bari C, Luyten F, Collen D, VandenDriessche T (2003) Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats. *Haemophilia* 9: 94-103.
49. Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK, Kurachi K (2003) Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins *in vivo*: Human Factor IX model. *J Gene Med*, 5: 11-7.
50. Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, Mosca J, Sturgeon C, Siatskas M, Mahmud N, Ferrer K, Deans R, Moseley A, Hoffman R, Devine SM (2001) Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 12: 1527-41.
51. Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D, Galipeau J (2004) Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther*, 10: 741-8.
52. Van Damme A, Thorrez L, Ma L, Vandeburgh H, Eyckmans J, Dell'Accio F, De Bari C, Luyten F, Lillcrap D, Collen D, VandenDriessche T, Chuah MK (2006) Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells* 24: 896-907.
53. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF, Mosca JD (2001) Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther*, 3: 857-66.
54. Pittenger MF, Martin BJ (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*, 95: 9-20.
55. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K (2004) Non haematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104: 3581-7.
56. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI (2004) Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, 117: 3-10.
57. Fukuda K (2002) Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol*, 325: 1027-38.
58. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y (2004) Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp Biol Med*, 229: 623-31.
59. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY (2003) Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126: 124-32.
60. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93-8.
61. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S (2004) Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2670-6.

62. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A (2003) *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 288: 51-9.
63. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 9: 1195-201.
64. Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR, Cohen IS (2004) Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*, 94: 952-9.
65. Deng W, Bivalacqua TJ, Chattergoon NN, Hyman AL, Jeter JR, Kadowitz PJ (2003) Adenoviral gene transfer of eNOS: High-level expression in *ex vivo* expanded marrow stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C1322-9.
66. Lou J, Tu Y, Ludwig FJ, Zhang J, Manske PR (1999) Effect of bone morphogenetic protein-2 gene transfer on mesenchymal progenitor cells. *Clin Orthop*, 369: 333-9.
67. Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Gannon FH, Lindsey RW, Davis AR (2003) Osteoinduction by *ex vivo* adenovirus-mediated BMP2 delivery is independent of cell type. *Gene Ther*, 10: 1289-96.
68. Blum JS, Barry MA, Mikos AG, Jansen JA (2003) *In vivo* evaluation of gene therapy vectors in *ex vivo*-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model. *Hum Gene Ther*, 14: 1689-701.
69. Chang SC, Chuang HL, Chen YR, Chen JK, Chung HY, Lu YL, Lin HY, Tai CL, Lou J (2003) *Ex vivo* gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene Ther*, 10: 2013-9.
70. Gysin R, Wergedal JE, Sheng MH, Kasukawa Y, Miyakoshi N, Chen ST, Peng H, Lau KH, Mohan S, Baylink DJ (2002) *Ex vivo* gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats. *Gene Ther*, 9: 991-9.
71. Zhang XS, Linkhart TA, Chen ST, Peng H, Wergedal JE, Gutierrez GG, Sheng MH, Lau KH, Baylink DJ (2004) Local *ex vivo* gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *J Gene Med*, 6: 4-15.
72. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW (2004) Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303: 1198-201.
73. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M (2004) Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1593-603.
74. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J (2004) Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther*, 15: 597-608.
75. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H (2004) Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*, 11: 1155-64.
76. Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT (2003) Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem Cells* 21: 389-404.
77. Niethammer AG, Wodrich H, Loeffler M, Lode HN, Emmerich K, Abdollahi A, Krempien R, Debus J, Huber PE, Reisfeld RA (2005) Multidrug resistance-1 (MDR-1): A new target for T cell-based immunotherapy. *FASEB J*, 19: 158-9.
78. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-72.
79. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-20.
80. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76.
81. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26: 101-6.

CAPÍTULO 7

La diabetes, una enfermedad clásica metabólica para una Terapia Génica y Terapia Celular del futuro

Alicia G. Gómez-Valadés, Anna Vidal, Jordi Bermúdez y Jose C. Perales

La diabetes mellitus es una enfermedad de etiología múltiple que se caracteriza por la incapacidad del organismo para mantener la homeostasis de la glucosa como consecuencia de la incapacidad del páncreas para secretar insulina (diabetes de tipo I) o por la resistencia de los tejidos sensibles a insulina (hígado, músculo y tejido adiposo) (diabetes de tipo II) (1-5).

El desorden más notable asociado a la diabetes es la hiperglucemia, responsable último de las derivaciones patológicas de la enfermedad. Las complicaciones secundarias asociadas son múltiples desde una patología microvascular en riñones y retina, hasta complicaciones neurológicas a nivel periférico, pasando por un mayor riesgo de sufrir arteriosclerosis o enfermedad cerebro-vascular y vascular periférica, e incluso mortalidad por infarto de miocardio. Actualmente, alrededor de un 3% de la población mundial padece diabetes y se prevé que esta cifra se duplique en 2030, debido, en gran parte, al dramático incremento en la incidencia de la obesidad, que suele estar ligada al desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo II.

La diabetes de tipo I (IDDM) se manifiesta generalmente antes de los 30 años de edad, frecuentemente durante la adolescencia, y representa entre el 5 y el 10% de los pacientes diabéticos. La causa es la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas con la consecuente supresión de secreción de insulina e incapacidad de los tejidos periféricos para metabolizar la glucosa, que se manifiesta en hiperglucemia y cetoacidosis. Los síntomas característicos de la enfermedad son la polifagia (incremento en la ingesta), poliuria (diuresis osmótica) y polidipsia (incremento de la sed), acompañado todo ello por la pérdida de peso. En estos pacientes, la única terapia farmacológica es la terapia sustitutiva con insulina. El principal problema en este tipo de terapias es que no existe una regulación fisiológica de la liberación de la insulina inyectada, dando lugar a frecuentes hipoglucemias, que conducen a una mayor morbilidad e incluso mayor mortalidad.

La diabetes de tipo II (NIDDM) es la más común, con una incidencia del 90 al 95% de los pacientes diabéticos. Se manifiesta en individuos adultos, generalmente mayores de 40 años, y se caracteriza por la incapacidad de los tejidos periféricos para responder a insulina (resistencia a insulina), alterando las acciones de la insulina sobre la captación de glucosa por parte del hígado y el músculo, disminuyendo la producción hepática de glucosa y la captación de ácidos grasos por el tejido adiposo, traduciéndose en unos niveles anormalmente elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). Un efecto compensatorio por parte de las células beta pancreáticas incrementa la secreción de insulina para mantener la vía de señalización de la insulina en los tejidos periféricos, circunstancia ésta que deriva en la disfunción de los islotes de Langerhans.

Tratamientos actuales de la diabetes

El tratamiento actual de la diabetes está claramente establecido con unas recomendaciones muy precisas respecto a las distintas actuaciones tanto para la diabetes de tipo I como para la de tipo II, así como respecto al establecimiento de medidas profilácticas para retrasar la aparición de la diabetes de tipo II (6-10).

Para el tratamiento de la diabetes tipo II existen actualmente diferentes fármacos, que actúan sobre diferentes órganos diana. Todos ellos, independientemente de su mecanismo

molecular de acción, repercuten en una sensibilización a la insulina en los tejidos periféricos e hígado (**Figura 1**).

Las *sulfonilureas* fueron los primeros fármacos antidiabéticos y promueven la secreción de insulina en las células beta del páncreas a través de su receptor específico. El incremento de insulina en sangre es suficiente para compensar la resistencia de los tejidos periféricos a la hormona, incrementando la captación de glucosa en el músculo y reduciendo la producción hepática de glucosa. Su efecto generalmente es transitorio y se requiere tratamiento sustitutivo con insulina.

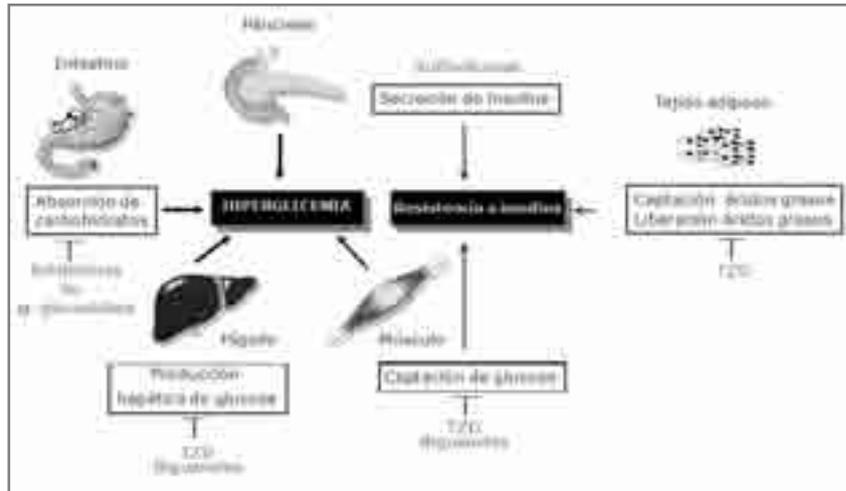


Figura 1. Estrategias para el tratamiento de la diabetes de tipo II que se relacionan con una sensibilización a la insulina en los tejidos periféricos e hígado.

Los *inhibidores de alfa-glucosidasa* actúan como inhibidores competitivos de las enzimas de la pared apical de los enterocitos que convierten disacáridos en monosacáridos, lo que se traduce en una disminución de la absorción de carbohidratos. Se utilizan en diabetes incipiente o como terapia combinada con otras drogas.

Las *tiazolidinedionas* (TZD) actúan como ligandos selectivos del receptor nuclear PPAR- γ —expresado principalmente en tejido adiposo e implicado en el control de la adipogénesis— que controla la transcripción de PEPCK, incrementando así la gliceroneogénesis y la re-esterificación de ácidos grasos en tejido adiposo. Así, la activación de PPAR- γ en tejido adiposo incrementa su capacidad de redirigir el exceso de grasas de la circulación, disminuyendo la concentración de ácidos grasos en sangre, con la consecuente sensibilización a insulina y reducción de la gluconeogénesis hepática. Sin embargo producen incremento de peso asociado al acumulo de grasas en el tejido adiposo, incremento de colesterol LDL y hepatotoxicidad.

Las *biguanidas*, como la metformina, constituyen actualmente los fármacos de primera elección para la diabetes de tipo II. El mecanismo molecular de la metformina está siendo objeto de intenso estudio aunque se sabe que su diana es el complejo I de la cadena de transporte de electrones, disminuyendo por tanto los niveles intracelulares de ATP. Esta bajada en la carga energética activa la quinasa dependiente de AMP (AMPK) que en el hígado estimula la captación y utilización de glucosa y la beta-oxidación e inhibe la gluconeogénesis y la lipogénesis, todo ello dirigido a la producción y ahorro de ATP. La metformina, en menor medida, también activa la captación y utilización de glucosa en músculo.

Los tratamientos farmacológicos actualmente en uso para la diabetes de tipo I y II no resultan totalmente satisfactorios ya que la eficacia de la monoterapia disminuye con el tiempo, haciendo necesario recurrir a una terapia combinada (sulfonilurea/metformina;

inhibidor de glucosidas/metformina; glitazona/metformina, etc.) con el fin de aprovechar el efecto sinérgico de los mecanismos de acción de los fármacos. Aun así, no se consigue un control total de la glucemia y, por lo tanto, no evitan la aparición de hipoglucemias ni complicaciones secundarias asociadas a la enfermedad.

En el caso de la diabetes de tipo I el tratamiento ideal sería aquel que consiguiera células secretoras de insulina de forma regulada. Las células del propio paciente serían las más adecuadas ya que se evitan los problemas de rechazo ante un posible trasplante. Por otra parte, conseguir células secretoras de insulina no pancreáticas, esquivaría la autoinmunidad contra las células beta característica de la diabetes de tipo I. En pacientes pre-diabéticos, la inmunomodulación podría salvar las células beta de la destrucción autoinmune, mientras que cuando ya se ha dado esta destrucción, solo queda inducir la regeneración de las células beta para restaurar la funcionalidad de los islotes. Alternativamente, se podrían usar células exógenas al paciente y manipularlas para que secreten insulina, previo trasplante. En el caso de la diabetes de tipo II, al tratarse de una enfermedad multifactorial de origen poligénico, la modulación de flujos metabólicos podría ser la clave para el control de la homeostasis de la glucosa.

Aproximaciones de la Terapia Génica *in vivo* y *ex vivo*

En principio, la transferencia génica se puede realizar *in vivo*, usando vectores tanto virales como no virales o incluso físicos, o *ex vivo*, modificando células originarias de un explante del paciente, las cuales son reimplantadas después de su manipulación *in vitro*.

Los requisitos más importantes para el diseño de un fármaco de Terapia Génica *in vivo* se pueden resumir como:

- Alta estabilidad en fluidos fisiológicos, compatible con una alta biodisponibilidad a nivel de órgano para evitar la degradación del DNA por nucleasas.
- Biodisponibilidad específica también a nivel de compartimento celular, en el citoplasma para nucleótidos antisentido y del gen en el núcleo.
- Posibilidad de readministrar, sin toxicidad ni respuesta inmune.
- Actividad farmacológica que corrija el fenotipo alterado para el cual fue diseñado.

En este sentido, mientras que la manipulación genética *in vitro* de islotes pancreáticos o células beta se ha conseguido con facilidad usando diferentes vectores, la manipulación genética del páncreas *in vivo* está en sus comienzos. El tropismo natural de los adenovirus hace que tras una inyección sistémica, éstos queden secuestrados en hígado, mientras que la inyección retrógrada en el conducto páncreo-biliar, a pesar de resultar eficiente en la transfección conlleva pancreatitis (11). La inyección sistémica de adenovirus después de un "bypass" temporal en la circulación hepática proporciona una transducción transitoria en páncreas exocrino y endocrino con una mínima peri-insulinitis en modelos animales murinos, demostrando el tropismo hacia páncreas exocrino de los adenovirus (12). Sin embargo, en modelos caninos, el bloqueo local de la circulación pancreática, conlleva la transducción de varios tipos celulares entre los que se encuentran el tejido conectivo, células acinares, ductales y células endocrinas (alfa y beta), sin aparentes signos de pancreatitis (13). En conclusión, el éxito de la transducción de genes en páncreas depende tanto del vector de elección como de la vía de administración.

En las aproximaciones *ex vivo*, las células se extraen del paciente tanto de médula ósea como de hígado o de páncreas; se cultivan y se modifican *in vitro* y finalmente se reimplantan (**Figura 2**). Introducir genes en estas células es más fácil y, además, permite

la verificación y control de las células post-transfección antes de ser reintroducidas en el paciente, minimizando la toxicidad del vector, ya que sólo infecta a la población de células deseada.

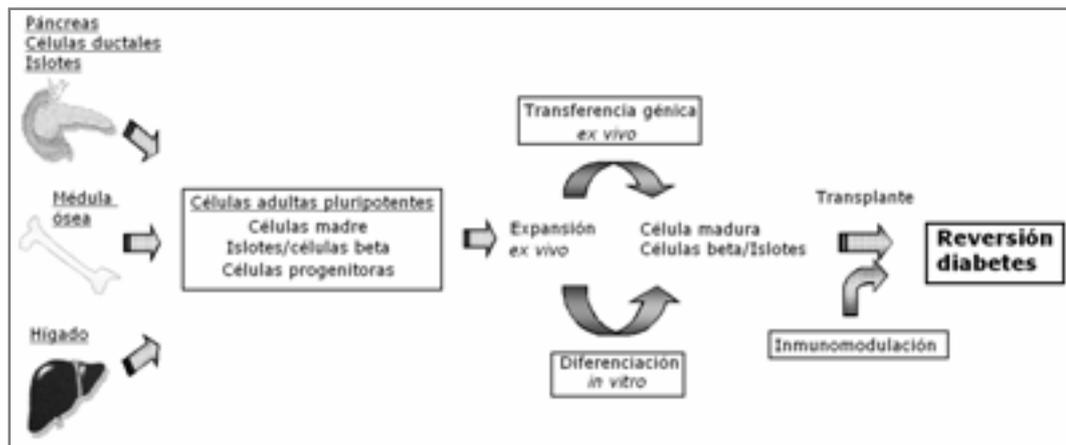


Figura 2. Terapia Génica *ex vivo* para la diabetes.

Aproximaciones terapéuticas génicas y celulares para la diabetes de tipo I

La diabetes de tipo I es una enfermedad de origen autoinmune de etiología desconocida donde las células beta del páncreas son destruidas tras una infiltración en los islotes de Langerhans de macrófagos y linfocitos T autoagresivos (insulinitis) frente a antígenos de la propia célula beta. Aunque la terapia sustitutiva de insulina puede llegar a controlar de forma global la hiperglucemia diabética y retrasar las complicaciones secundarias asociadas a la diabetes, la puesta en práctica no resulta siempre satisfactoria debido al estricto régimen a que se han de someter los pacientes, así como el control continuo necesario para asegurar una glucemia normal. El resultado es que la glucemia no se regula apropiadamente, se dan episodios de hipoglucemia y no se consigue siempre prevenir la aparición de complicaciones secundarias. El control efectivo y permanente de la glucemia en enfermos con diabetes de tipo I requiere del desarrollo de un sistema endógeno sustitutivo de producción de insulina que permita el mantenimiento de niveles fisiológicos de insulina, consiguiendo así un control estricto de la glucemia.

El transplante de páncreas, células beta o islotes de Langerhans, puede llegar a restituir la normoglucemia a largo plazo, sin embargo, requiere de terapia inmunosupresora de por vida para evitar ataques recurrentes autoinmunes y/o de rechazo. Además, su aplicación está restringida por la limitación de donantes. Las alternativas que están siendo exploradas activamente incluyen la regeneración de células beta productoras de insulina a partir de células pancreáticas o extrapancreáticas (14) o la Terapia Génica para producir insulina, que implica la manipulación genética de órganos diferentes del páncreas para que secreten de forma ectópica insulina bajo el control de promotores sensibles a glucosa, aunque, de momento, no existe ninguna opción que reemplace en la clínica a la terapia sustitutiva de insulina exógena.

Expresión ectópica de insulina

Siendo la raíz de la diabetes de tipo I la falta de insulina, parece evidente que esta es una enfermedad candidata para aplicar una estrategia de Terapia Génica para restituir la expresión de la hormona. Además, la producción ectópica de insulina (15) ofrece la ventaja de “esquivar” el ataque autoinmune de que son objeto las células beta pancreáticas. Para conseguir resultados satisfactorios es necesario concebir un sistema que cumpla los siguientes requisitos:

- Un sistema de transferencia génica eficaz, seguro y específico para la célula diana.
- Las células diana han de disponer de una maquinaria de procesamiento de pro-insulina hasta insulina madura.
- Un sistema de control de la expresión, almacenamiento y secreción de insulina sensible a la concentración de glucosa en sangre, capaz de responder de forma rápida y eficaz.

Las células beta poseen una maquinaria de procesamiento y secreción de la insulina que incluye endoproteasas (PC2 y PC3) que procesan la pre-proinsulina inmadura hasta proinsulina e insulina en sucesivos pasos (**Figura 3**); también existen los llamados gránulos secretorios, que almacenan insulina, y los sistemas de regulación sensibles a glucosa que regulan la rápida secreción de la insulina contenida en estos gránulos y la transcripción *de novo* de insulina (16). Por tanto, la célula diana secretora de insulina ideal debería tener las mismas características a fin de proporcionar una regulación fisiológica de la glucemia.

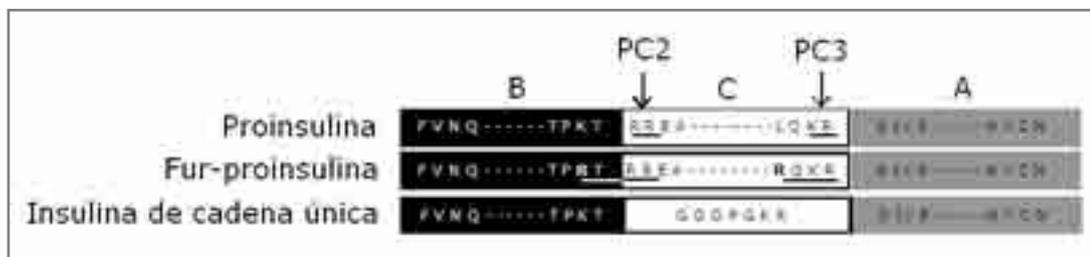


Figura 3. Estrategias para la producción ectópica de insulina. En las células beta la pro-insulina es procesada por las peptidasas PC2 y PC3. La insulina modificada (la mutación se muestra en negrita) es procesable por furina ya que ésta reconoce la secuencia aminoacídica Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg. En la insulina de cadena simple el péptido C se sustituye por un péptido de unión (Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg).

Así, las células neuroendocrinas poseen una maquinaria de procesamiento y secreción similar a las células beta mostrándose capaces de secretar insulina activa *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo carecen de capacidad de respuesta a fluctuaciones en los niveles de glucosa. Otro tipo de células son las células K del intestino que son células endocrinas que secretan la hormona GIP (*"glucose dependent insulinotropic polypeptide"*), que facilita la liberación de insulina tras una ingesta. Parece ser que la síntesis y liberación de GIP es dependiente de glucosa. El paralelismo entre el mecanismo y la cinética de secreción de insulina en las células beta y de GIP en las células K convierten a éstas últimas en excelentes candidatas para secretar insulina. Recientemente, se ha demostrado en modelos animales murinos que el DNA genómico de insulina humana bajo el control de una región 5' reguladora de GIP es capaz de producir insulina biológicamente activa *in vivo* de forma tejido-específica en las células del duodeno y el estómago, ejerciendo un efecto protector sobre la inducción de diabetes por estreptozotocina, a pesar de la destrucción de las células beta pancreáticas. Sin embargo, queda pendiente el desarrollo de un sistema de transfección eficiente y selectivo para este tipo celular antes de poder aplicar esta estrategia de Terapia Génica *in vivo*. Los hepatocitos también secretan insulina ya que poseen un sistema sensible a glucosa que incluye a la glucoquinasa (GK) y el transportador de glucosa de tipo 2 (Glut2), aunque no presentan el canal calcio dependiente de voltaje de las células beta en el control de la secreción de insulina acoplada a las fluctuaciones de glucosa. En el hígado, muchos genes se regulan transcripcionalmente de forma directa, o indirecta en función de los niveles de glucosa en sangre (17). Además, el hígado es un órgano fácilmente accesible por métodos de transfección tanto virales como no virales. La principal desventaja es que los hepatocitos no poseen la maquinaria de procesamiento de la pro-insulina, ni gránulos secretorios que almacenen y liberen rápidamente la insulina en respuesta a glucosa. Esta

podría ser la causa de que las actuales aproximaciones no resulten eficaces en la normalización de la tolerancia a la glucosa ni eviten episodios de hipoglucemia.

El músculo podría ser una buena diana para la expresión ectópica de insulina por abarcar gran parte de la masa corporal y por su accesibilidad, aunque carece de capacidad de procesar la pre-proinsulina y de sistemas de regulación sensibles a glucosa. Una forma de superar el problema del procesamiento de la pre-proinsulina en músculo es el diseño de construcciones de expresión donde un promotor sensible a glucosa regula la transcripción de proteasas —furin proteasas, proteasa PC3, etc.— capaces de procesar una pre-proinsulina cuya secuencia ha sido modificada para ser hidrolizada por estas proteasas alternativas (**Figura 3**).

En cuanto al sistema de control de expresión y secreción de la insulina para conseguir una biosíntesis de la hormona en respuesta a glucosa, se han desarrollado construcciones reguladas por promotores sensibles a glucosa como por ejemplo el de la isoforma hepática de la piruvato quinasa (L-PK). La mayoría de las estrategias se basan en un control transcripcional de la insulina en respuesta a glucosa, incapaz de generar un incremento inmediato en la secreción, proporcionando una respuesta lenta respecto a la secreción fisiológica de insulina. Las actuales aproximaciones de secreción ectópica de insulina no permiten el control temporal exquisito de la secreción, por lo cual no son totalmente eficaces en la normalización de la tolerancia a la glucosa ni evitan episodios de hipoglucemia. La rápida liberación de insulina desde los gránulos de almacenamiento en respuesta a las fluctuaciones de glucosa, se podría conseguir con métodos de regulación artificiales post-traduccionales. Se podría pensar en un sistema de regulación de secreción de proteínas desde el retículo endoplásmico que implicara la expresión de insulina como una proteína de fusión con un dominio de agregación que le permitiera acumularse en el retículo endoplásmico. En efecto, se ha conseguido, de esta forma, la secreción de insulina administrando drogas de administración oral que promueven la disgregación de los gránulos y la consiguiente secreción de insulina bio-activa. Así, transplantando células de fibrosarcoma transfectadas con esta construcción, se ha conseguido regular la glucemia de forma transitoria en ratones tratados con estreptozotocina (18).

Para evitar la necesidad del procesamiento de la pre-proinsulina en aquellos modelos de expresión ectópica que carecen de la maquinaria necesaria, se han introducido mutaciones en la secuencia de la proinsulina para hacerla susceptible a la furina, una endoproteasa muy ubicua y activa en diferentes tipos celulares. Usando esta secuencia mutada de la insulina se ha conseguido la secreción de insulina en diferentes modelos celulares, siendo especialmente eficaz en hígado por lo comentado anteriormente. Otra opción ha sido reducir la secuencia del péptido C de la pro-insulina al mínimo ("*linker*", de siete aminoácidos) para prescindir del procesamiento por endoproteasas manteniendo su actividad biológica. Esta forma recombinante de insulina —insulina de cadena única—, aunque no necesita procesamiento enzimático para ser secretada, se ha mostrado menos activa que la insulina fisiológica normal ("*wild type*"). Mediante la construcción de un vector de expresión adenoasociado regulado por el promotor de L-PK se obtuvo su expresión ectópica en hígado en respuesta a glucosa, con la consecuente remisión de la hiperglucemia durante varios meses en ratones NOD (19). Cabe decir, sin embargo, que en respuesta a una carga única "*bolus*" de glucosa, se observó un cierto retraso en el incremento de secreción de insulina y en la recuperación de la glucemia, así como una ligera tendencia a hipoglucemia entre las 3 y las 6 horas posteriores. Estos datos indican que todavía es necesario más refinamiento en las estrategias para conseguir mimetizar el control de secreción de la célula beta pancreática.

Aunque se han conseguido sistemas de secreción de insulina sensibles a glucosa, todavía es un reto conseguir un sistema capaz de mimetizar la secreción fisiológica que se da en las células beta del páncreas, que es necesario para el control de la glucemia dentro de los estrechos márgenes fisiológicos admisibles y de forma rápida en respuesta a las fluctuaciones de glucosa. Estas limitaciones hacen que las aplicaciones de la producción

ectópica de insulina mediante estrategias de Terapia Génica *in vivo* estén todavía lejos de una aplicabilidad clínica real. Aunque sí es verdad que las células K se han mostrado como una excelente alternativa ya que poseen la maquinaria de regulación y procesamiento endógena similar a la de las células beta, todavía se precisa mejorar la eficacia de transfección de los vectores, la selectividad de tejido ("*delivery*") y la seguridad de los procedimientos.

Inducción, en hígado, de neogénesis de islotes pancreáticos secretores de insulina

La conversión fenotípica de células hepáticas en células pancreáticas es factible desde un punto de vista tanto filogenético como ontogénico (20). Las células hepáticas contienen factores de transcripción, co-factores y cromatina sensibles a los efectos de determinados factores de crecimiento pancreáticos pro-endocrinos. Así, en respuesta a determinados factores de transcripción se desencadena una cascada de señalización que desemboca en un proceso de *transdiferenciación* que conduce a un fenotipo modelo de célula beta que genera tanto *in vivo* como *ex vivo*, conjuntos celulares o islotes ectópicos que disponen de la maquinaria necesaria para regular la secreción y procesamiento de insulina. Además, estos cambios fenotípicos parecen ser persistentes en el tiempo. Recientes estudios demuestran la capacidad de generar estos islotes en hígado *in vivo* con expresión de marcadores de páncreas endocrino y la subsiguiente reversión de la hiperglucemia diabética en modelos murinos de diabetes inducida por estreptozotocina (21). Este es un salto cualitativo en la medicina regenerativa, ya que abre la posibilidad de desarrollar "órganos ectópicos" a partir de los tejidos del propio paciente.

PDX-1 es un factor esencial tanto en el desarrollo embrionario del páncreas endocrino y exocrino como en la diferenciación del páncreas endocrino, estando su expresión limitada a las células beta adultas. La sobre-expresión transitoria de *PDX-1* en hígado mediante vectores adenovirales genera agrupamientos secretores de insulina biológicamente activa, capaces de mejorar la hiperglucemia en ratones inyectados con insulina (22). En estudios a largo plazo se observó que la expresión transitoria de *PDX-1* exógeno estimulaba la expresión de *PDX-1* endógeno, autoalimentando una cascada de transdiferenciación a célula pancreática, que terminaba con la expresión de insulina y de marcadores pancreáticos endocrinos así como con el establecimiento de toda la maquinaria necesaria para la secreción de insulina durante meses. Sin embargo, los altos niveles de *PDX-1*, necesarios para obtener un efecto hipoglucemiante, potenciaban la expresión de genes exocrinos, como la elastasa-1 (23) o la tripsina (24), que provocan una hepatotoxicidad de autodigestión. Por tanto, los estudios realizados parecen indicar que *PDX-1* no sería el factor idóneo para una aproximación de una Terapia Génica *in vivo*. No obstante su aplicabilidad *ex vivo*, donde se puede potenciar el linaje endocrino, es mucho más factible ya que se ha comprobado que células hepáticas adultas tratadas *in vitro* con *PDX-1*, antes de implantarse en la cápsula renal de ratones diabéticos, secretan, de forma regulada, insulina activa durante largos periodos de tiempo, mejorando la hiperglucemia y sin toxicidad inducida por proteasas exocrinas (25).

NeuroD/β2 es un factor pro-endocrino —"*downstream*" de *PDX-1*— que no está implicado en el desarrollo de páncreas exocrino. Aunque la expresión hepática de *NeuroD/β2* usando vectores adenovirales mejora la glucemia, los mejores resultados se obtienen mediante la co-expresión de *NeuroD/β* con beta-celulina —factor de crecimiento de la célula beta—, que conlleva la normalización de la glucemia y la tolerancia a glucosa. Esta combinación ha conseguido la generación de agregados celulares secretores de insulina con un fenotipo mucho más próximo al de la célula beta, sin promover la expresión de genes exocrinos, ni toxicidad asociada (24).

De hecho, este y otros estudios nos llevarían a pensar que los mejores resultados podrían venir de la combinación de varios factores, consiguiendo así un efecto sinérgico (26).

Regeneración de islotes y células beta a partir de células madre

La posibilidad de generar *ex vivo* células beta a partir de células madre ofrece perspectivas excitantes. Sin embargo, es necesario entender en profundidad los mecanismos de diferenciación de una célula madre hasta llegar a ser una célula beta, antes de poder obtener modelos *in vivo* de diferenciación controlada.

Recientes estudios han demostrado la posibilidad de regenerar los islotes a partir de células madre adultas originarias no sólo de médula ósea, sino de otros órganos y tejidos, entre ellos el páncreas (27), donde se han identificado poblaciones de células pluripotenciales (MAPC, "*multipotent adult pleuripotent cell*" y SP, "*side population cell*") que parecen tener un papel importante en la reparación y regeneración de los tejidos. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la transformación estable *in vivo* de estos linajes en células beta.

El papel de las células de la médula ósea, transplantadas, en la regeneración de los islotes pancreáticos en modelos murinos inmunodeprimidos con diabetes inducida por estreptozotocina es controvertido ya que algunos autores demuestran una reversión de la hiperglucemia mientras que otros ponen en duda la contribución de las células derivadas de médula ósea en una posible neogénesis de islotes (28).

Las células madre embrionarias son totipotentes y podrían potencialmente ser diferenciadas mediante manipulación genética *ex vivo* a células productoras de insulina (29). Sin embargo, otros autores cuestionan la interpretación de los datos, argumentando que la insulina detectada en las células embrionarias proviene, en realidad, de su captación del medio de diferenciación (30).

Es necesario, por tanto, optimizar el protocolo de diferenciación de las células madre embrionarias, así como entender los mecanismos de diferenciación para poder pensar en la utilidad de estas células para regenerar tejidos.

Transplante de islotes: Terapia ex vivo adyuvante

El transplante de páncreas es el recurso más frecuentemente empleado para reemplazar células beta en pacientes. Sin embargo, la limitación de donantes y la necesidad de terapia inmunosupresora post-transplante limitan su aplicabilidad. En un principio, el transplante alogénico de islotes pancreáticos abrió la posibilidad de obtener una secreción de insulina regulada fisiológicamente, aunque entre las limitaciones de esta técnica se incluyen la pérdida de islotes por apoptosis inducida durante el proceso de aislamiento y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que limitan la supervivencia de los islotes transplantados en el donante. En estas condiciones, la viabilidad de los implantes es corta, haciendo necesario reiniciar la administración exógena de insulina e incluso un segundo transplante, volviendo, a medio plazo a una dependencia absoluta de insulina (31). Sin embargo, la manipulación genética *ex vivo* de los islotes antes del transplante podría ayudar a superar estas limitaciones.

Así, en los días posteriores al transplante los islotes son especialmente susceptibles a muerte por apoptosis y necrosis. El tratamiento de los islotes aislados con inhibidores de apoptosis, como zVAD.fmk antes del transplante, mejora su viabilidad en el paciente receptor (32). Por otro lado, la citoquina interleuquina-1 (IL-1) tiene efectos deletéreos tanto sobre la replicación como sobre la viabilidad de los islotes aislados. Se ha visto que el agonista del receptor de interleuquina-1 (IL1RN) es un inhibidor natural de la acción de IL-1 (33), y que la sobreproducción de IL1RN en los islotes aislados, mediante infección *ex vivo* con adenovirus recombinantes, mejora la replicación y masa de los islotes una vez transplantados. Así se reduce el número de islotes necesarios a transplantar para lograr la normoglucemia (34). Finalmente, el uso *ex vivo* de factores como GLP-1 y HNF han proporcionado una mayor eficacia en el número de islotes y su tamaño y en la cantidad de insulina que secretan gracias, en parte, a una mayor viabilidad de los islotes aislados (35).

Inmunomodulación: Vacunación con DNA

Las aproximaciones vistas hasta ahora no dejan de ser terapias sustitutivas. Para una recuperación total de la diabetes de tipo I sería necesaria la regeneración de las células beta pancreáticas y su preservación mediante la prevención de la autoinmunidad.

La autoinmunidad característica de la diabetes de tipo I está dirigida contra múltiples antígenos de la célula beta, aunque los más estudiados son la insulina y sus precursores (36), y la glutamato descarboxilasa-65 (GAD65). Diversos estudios describen la inducción de tolerancia inmunológica protectora frente al desarrollo de diabetes de tipo I tras la “vacunación” con DNA en modelos de ratón NOD (37). En la mayoría de los estudios, esta “vacunación” se consigue mediante la inyección intramuscular o electroporación de DNA plasmídico que codifica uno o más autoantígenos pancreáticos. Sin embargo, en muchos casos se promueve una respuesta inmunológica Th2, que podría desencadenar reacciones alérgicas incontroladas (38). Estudios más recientes describen la producción de una población de linfocitos T reguladores (TrCD4P⁺) que contrarrestan la respuesta Th2 por efecto inmunosupresor tras la administración intranasal de un cDNA de pro-insulina (39). Aunque sin efecto significativo sobre la incidencia de la diabetes, estos estudios abren las puertas a un efecto protector sin riesgos inmunológicos colaterales. Finalmente, la inducción de tolerancia a través de la “vacunación” con DNA ha resultado especialmente evidente cuando se implica al regulador negativo de linfocitos (T-CTLA-4) (37). En estos estudios la co-inmunización del autoantígeno —construcción quimérica para pre-proinsulina y GAD65— con B7-1 —ligando de CTLA-4—, incrementó la población de linfocitos T reguladores y protegió el desarrollo de diabetes de tipo I.

Sin embargo, este tipo de terapia preventiva está limitada por la inexistencia de marcadores inequívocos indicativos del riesgo del desarrollo de diabetes de tipo I.

Aproximaciones terapéuticas génicas y celulares para la diabetes de tipo II

La diabetes de tipo II es una enfermedad multigénica y multifactorial cuya característica principal es la resistencia a la insulina, que impide que la hormona inhiba la producción hepática de glucosa y active la captación de glucosa en músculo. Los fármacos antidiabéticos (biguanidas y tiazolidinedionas) inducen un incremento de la sensibilidad a insulina en los tejidos periféricos. Sin embargo, su mecanismo de acción implica la activación de factores que se encuentran por encima de las vías de control del metabolismo energético, implicados en multitud de procesos fisiológicos que podrían repercutir en efectos secundarios indeseados (10).

En individuos diabéticos, la alteración en la gluconeogénesis secundaria a la resistencia a insulina conlleva un incremento en la producción hepática de glucosa que se refleja en una hiperglucemia sostenida. Por tanto, la regulación de la gluconeogénesis hepática representa un punto importante para conseguir ajustar la glucemia en modelos diabéticos. La producción de glucosa hepática está sujeta a un estricto control hormonal, de sustratos y otros factores (40). Las aproximaciones de Terapia Génica en diabetes de tipo II intentan, mediante intervenciones específicas sobre puntos clave en el control de los flujos metabólicos, evaluar dianas y los efectos que su modulación tiene en la homeostasis de los niveles de glucosa y de lípidos, así como su efectividad en la regulación de la glucemia y el fenotipo diabético. Múltiples abordajes han utilizado tanto la tecnología del RNAi (siRNA) como de oligonucleótidos antisentido (ASO) o sobre-expresión de proteínas y factores de transcripción de la vía de señalización de insulina y/o en la regulación de la gluconeogénesis hepática. Estos estudios han resultado fundamentales para dilucidar los mecanismos de control de la homeostasis energética y establecer posibles dianas terapéuticas (**Figura 4**).

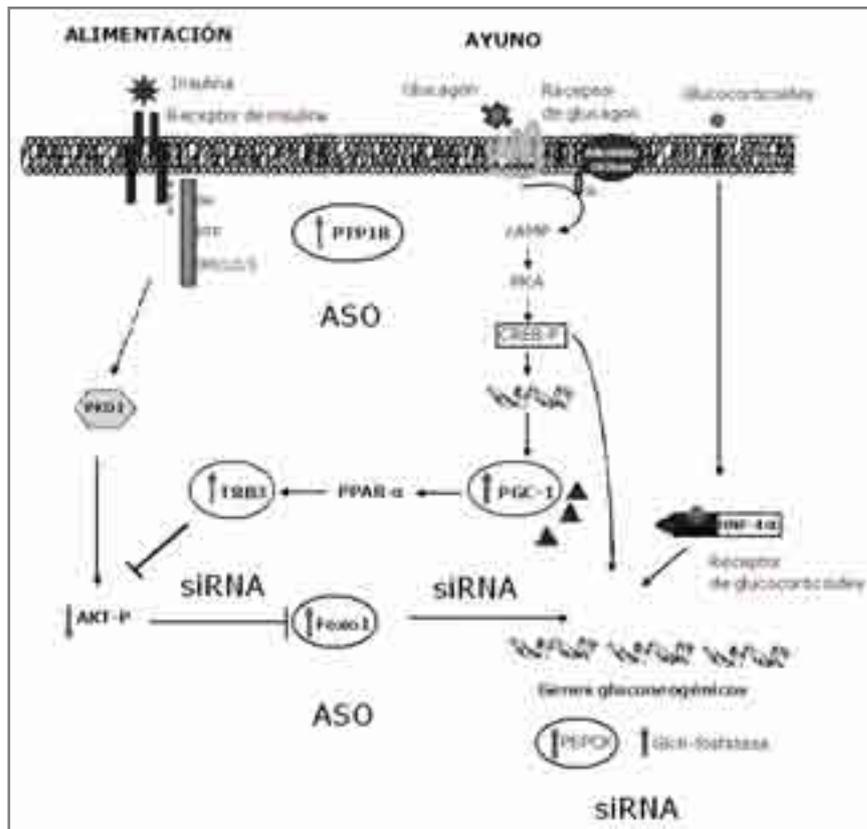


Figura 4. Vías de señalización que controlan la gluconeogénesis en hígado. Con flechas se señalan los mediadores o enzimas (dianas) de la vía que están alterados en diabetes. Las estrategias de silenciamiento basadas en ASO o siRNA como aproximaciones terapéuticas para diabetes de tipo II se indican con un ovoide alrededor de esas dianas.

Silenciamiento de proteínas implicadas en el desarrollo de la patología

En 1998, Andrew Fire y Craig Mello, en sus estudios en *C. elegans*, observaron que el dsRNA tenía mayor eficacia para inhibir la expresión génica que las secuencias sentido y antisentido por separado y que, además, este efecto de silenciamiento era sistémico y heredable, describiendo por primera vez el fenómeno del RNA de interferencia (RNAi) que más extensamente se trata en otro capítulo de este libro.

El RNAi ha revolucionado la investigación biomédica, ya que permite identificar la función de los genes y establecerlos como dianas potenciales terapéuticas. No es raro, entonces, que múltiples compañías farmacéuticas estén invirtiendo sus presupuestos en desarrollar terapias basadas en el RNAi (41).

En las aplicaciones terapéuticas basadas en el RNAi, la barrera más importante ha sido la liberación y la estabilidad de la molécula en el organismo. La accesibilidad del hígado ha facilitado el establecimiento de dianas farmacológicas en este órgano. Ya en los estudios iniciales se observó que tras la inyección endovenosa hidrodinámica —técnica de transferencia génica no viral— (42) de siRNA (43), o de vectores “small-hairpin” RNAs (shRNA) (44), el hígado era el principal órgano diana. Sin embargo, estos métodos proporcionan una eficacia de silenciamiento limitada y una expresión transitoria durante unos pocos días. El tropismo natural de los adenovirus ha permitido la liberación de shRNA en hígado de forma más eficaz y relativamente más duradera, permitiendo estudios metabólicos de establecimiento de dianas.

Así, en modelos murinos de diabetes el PGC-1 (peroxisome proliferator-activated (PPAR)- α coactivator-1) que es un factor de transcripción implicado en la regulación de genes

gluconeogénicos y de oxidación de ácidos grasos, se encuentra sobre-expresado con la consiguiente activación constitutiva de la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos a través de su interacción con HNF-4 y PPAR- α respectivamente. El silenciamiento de PGC-1 en ratones^{db/db} se tradujo en una reducción de enzimas gluconeogénicas (PEPCK y G-6-fosfatasa) y de la beta oxidación (CPT-1, MCAD, AOX) así como en la normalización de la glucemia en ayunas y mejora de la tolerancia a glucosa y sensibilidad hepática a insulina (45). Esto último podría ser reflejo, en parte, de una bajada, secundaria al silenciamiento de PGC-1, en los niveles de expresión de TRB-3, factor inducible por ayuno inhibidor de Akt/PKB (46) (**Figura 4**). De hecho el silenciamiento específico de TRB-3 comporta una mejora de la curva de tolerancia a la glucosa (47).

Estudios anteriores en ratón demostraron, utilizando vectores plasmídicos para expresar un shRNA contra la PEPCK —enzima limitante de la gluconeogénesis— que el silenciamiento parcial (50%) y transitorio de esta enzima provocaba una mejora de la glucemia en ayunas y de la tolerancia a glucosa en modelos animales diabéticos inyectados con estreptozotocina (48). El uso de vectores adenovirales para vehiculizar construcciones de expresión de este shRNA, no sólo permite obtener eficacias de silenciamiento de hasta un 90% (**Figura 5**), sino que también el efecto es más duradero (hasta tres semanas después de la inyección del vector). Además, en modelos animales de diabetes de tipo II (ratón^{db/db}) se observa mediante el mismo protocolo una disminución de la glucemia equivalente al de un tratamiento farmacológico con metformina (400 mg/kg), estableciéndose de esta forma a la PEPCK como posible diana en una Terapia Génica hipoglucemiante.

Sin embargo, el potencial terapéutico de las estrategias basadas en el RNAi está comprometido por la liberación, en términos de dosis, especificidad y estabilidad en fluidos fisiológicos, de la molécula sintética de siRNA. Ya que la inyección sistémica de la molécula sintética sin vehiculización resulta ineficaz, se comienzan a ensayar modificaciones en las secuencias de los siRNA para incrementar su estabilidad en fluidos biológicos y permitir una internalización específica de tejido —para mejorar significativamente sus propiedades farmacocinéticas—, lo que se traduciría en una mayor eficacia de silenciamiento de dianas endógenas (49); también en este sentido resultan eficaces en formulación liposómica (50). Esto podría ser el futuro de una posible terapia basada en los RNAi, ya que permitiría una administración sistémica a dosis farmacológicas.

Otra estrategia para el silenciamiento de proteínas es la utilización de oligonucleótidos antisentido de RNA, DNA o análogos de ácidos nucleicos (ANA), sintetizados químicamente, y que presentan una alta homología con los mRNAs de las proteínas diana que se precisan silenciar. El mecanismo de actuación es su apareamiento bloqueando el proceso de traducción de un mRNA o activando su degradación. Para aumentar la resistencia a nucleasas, su disponibilidad sistémica y su tiempo de residencia en plasma y dentro de la célula, y aumentar por tanto su actividad farmacológica *in vivo*, los ASO requieren de modificaciones químicas específicas en su estructura (51). Tras una inyección intraperitoneal de ASO, éstos se acumulan y causan una reducción de mRNAs diana en tejidos como el hígado o el tejido adiposo, pero no en músculo. La biodistribución, así como los tejidos en que se expresan los mRNAs diana son factores a tener en cuenta al escoger los ASO como técnica de silenciamiento. Algunos de estos ASO modificados químicamente se han dirigido, por ejemplo, contra Foxo1 y PTP1B con buenos resultados tanto en estudios preclínicos como en fase clínica.

Foxo1 pertenece a una familia de factores de transcripción de localización nuclear, que se expresa fundamentalmente en hígado y en células beta pancreáticas. Juega un papel esencial en la inhibición de la gluconeogénesis hepática en respuesta a insulina y en la supervivencia de las células beta, regulando la transcripción de los genes gluconeogénicos de la glucosa-6-fosfatasa y de la PEPCK (52), así como del factor *pdx*. En ausencia de insulina, Foxo1 se encuentra directamente unido a los elementos de respuesta a insulina (IRE) del promotor del gen diana.

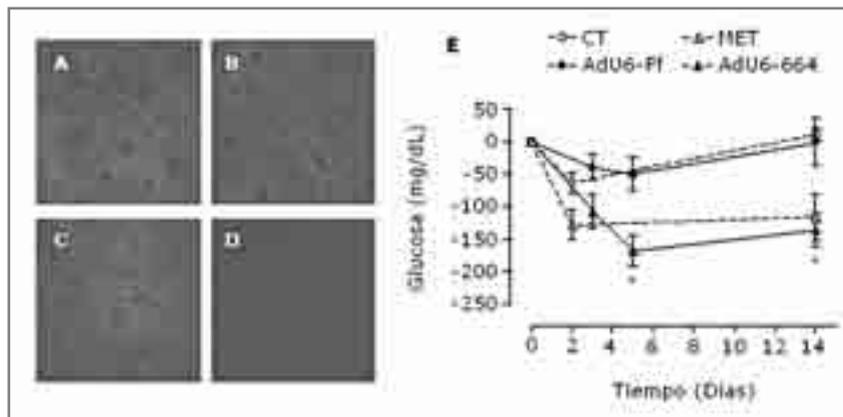


Figura 5. Silenciamiento de PEPCK en hígado utilizando técnicas de transferencia génica no viral (transferencia génica hidrodinámica) y vectores adenovirales. Las imágenes de microscopía confocal muestran la inmunodetección de PEPCK en secciones de hígado de ratón diabético después de dos días desde la inyección hidrodinámica (A,B) o después de catorce días usando un vector adenoviral (C,D). Los animales fueron inyectados con vectores de expresión de shRNA inespecífico (A,C) o dirigido contra PEPCK (B,D). Las fotos muestran los máximos niveles de silenciamiento conseguidos con ambas técnicas. Mientras que la inyección hidrodinámica de vectores de shRNA no permite ver silenciamiento del gen diana más allá de 72 horas después de la inyección, la infección con vectores adenovirales de shRNA permite obtener un efecto que perdura hasta tres semanas sin necesidad de inmunosupresión. E) Como consecuencia del silenciamiento de PEPCK en ratones diabéticos *lepr^{-/-}db/db* la glucemia en alimentación se redujo de manera similar a un tratamiento oral con metformina (400 mg/kg).

La fosforilación mediada por Akt de Foxo1 en respuesta a insulina, conlleva su exclusión del núcleo, inactivación, ubiquitinización y finalmente su degradación (53). Un incremento en la actividad de Foxo1 en hígado y células beta pancreáticas desemboca en diabetes como consecuencia de un efecto combinado del incremento de producción de insulina y la incapacidad de compensación por parte del páncreas (54). En hígados de animales obesos resistentes a insulina, la expresión de Foxo1 está incrementada y su localización es predominantemente nuclear, correspondiendo a una mayor actividad transcripcional. Los niveles del mRNA de las enzimas gluconeogénicas G-6-fosfatasa y PEPCK van en paralelo a la actividad de Foxo1. Además, la sobre-expresión de Foxo1 en hígado de animales sanos repercute negativamente en la tolerancia a glucosa y la insulinemia, mientras que la pérdida de su función en hígado de animales diabéticos mejora la tolerancia a glucosa (55). Estos resultados apuntan a que la reducción de Foxo1 en estados diabéticos restituiría la acción de la insulina a nivel transcripcional. En esta línea, Samuel y colaboradores han demostrado recientemente un leve silenciamiento de Foxo1 en hígado mediante el uso oligonucleótidos antisentido (ISIS-188764) en animales sanos y obesos (56). En animales obesos se observó una reducción en el mRNA de las enzimas gluconeogénicas G-6-fosfatasa y PEPCK en hígado con la consiguiente disminución en la producción endógena de glucosa, que repercutió en la mejora de la glucemia, de la tolerancia a glucosa y de la insulinemia. El tratamiento con ASO también mejoró la sensibilidad a insulina en cierta medida, no solo en hígado, sino también en tejido adiposo, aunque no en músculo. Aunque la reversión del fenotipo diabético no es total, debido a cuestiones de biodistribución y/o eficacia en la liberación o actividad de los ASO, sí que estos estudios apoyan la hipótesis de que una terapia basada en la reducción de Foxo1 en tejidos sensibles a insulina puede contribuir a la mejora de la respuesta a la hormona.

Por otro lado, múltiples evidencias sugieren que la acumulación de lípidos en hígado, ya sea en NAFLD (*“non alcoholic fatty liver disease”*) o en estados pre-diabéticos, está directamente ligado al desarrollo de resistencia a insulina y al incremento de la producción

hepática de glucosa, elementos claves en la patogénesis de la diabetes de tipo II (57). La reducción de la lipogénesis hepática podría, por tanto, ser una estrategia terapéutica en estas situaciones patológicas. La acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la síntesis de malonil-CoA, que es, a la vez, sustrato de la síntesis de ácidos grasos e inhibidor alostérico de la carnitina palmitoil transferasa (CPT-1), enzima limitante de la β -oxidación de ácidos grasos. Por tanto, el malonil-CoA es un regulador fisiológico clave en la homeóstasis lipídica. Existen dos isoformas de ACC, la ACC-1 que se localiza en tejidos lipogénicos (hígado y tejido adiposo) y la ACC-2 que se localiza en tejidos oxidativos (hígado, corazón y músculo esquelético), sugiriendo la existencia de dos acervos metabólicos de malonil-CoA implicados en la regulación de la lipogénesis *de novo* y de la β -oxidación de ácidos grasos respectivamente (58), aunque recientes investigaciones sugieren que puede existir un flujo entre esos acervos, que compensaría la ausencia de una de las isoformas. Así, para suprimir la lipogénesis hepática sería necesaria la inhibición de ambas isoformas. Savage y colaboradores han demostrado (59) que la inhibición de ACC-1 y ACC-2 en hígado utilizando un oligonucleótido con actividad sobre las dos isoformas, tiene un efecto sinérgico en la inducción de la β -oxidación de ácidos grasos, respecto a la silenciamiento de cada una de las formas por separado. Esto, en modelos animales de hígado graso inducido por dieta, repercute en una menor lipogénesis y producción hepática de glucosa y una mejora de la sensibilidad hepática a insulina.

La resistencia a insulina está condicionada fundamentalmente por dos factores de riesgo, la obesidad y los procesos inflamatorios (60). En la cascada de señalización de insulina la fosforilación y desfosforilación de residuos de serina y de tirosina juegan un papel fundamental en su regulación, de manera que una disregulación a este nivel puede desencadenar resistencia a insulina. Aún así, el papel de una posible disregulación de estas quinasas y fosfatasa en diabetes y el desarrollo de resistencia a insulina no está del todo esclarecido. PTP1B es una fosfatasa que interacciona y desfosforila el receptor de la insulina, IRS-1 y IRS-2, regulando negativamente la cascada de señalización de insulina. Los niveles de esta fosfatasa están incrementados en pacientes obesos con resistencia a insulina mientras que en modelos animales "*knock out*" para PTP1B se observa una hipersensibilidad a insulina y una resistencia a desarrollar obesidad en respuesta a una dieta rica en grasas. En estudios con ratones obesos que exhibían una marcada resistencia a insulina (ob/ob), el uso de oligonucleótidos antisentido resultó en una reducción del 50% en los niveles de proteínas en hígado y tejido adiposo, igualándolos a los equivalentes en animal sano (ob/-). También se redujeron los niveles de glucosa e insulina plasmáticos post-pandriales y se mejoró la tolerancia a glucosa e insulina. Esta reducción de los niveles de PTP1B mejora la señalización de insulina en músculo e hígado pero no en tejido adiposo. Estos resultados demuestran que la normalización de los niveles de PTP1B en hígado y tejido adiposo es suficiente para mejorar la señalización a insulina en tejidos sensibles a insulina, sugiriendo que la modulación farmacológica de PTP1B puede ser una buena diana terapéutica en el tratamiento de la diabetes de tipo II.

Sin embargo, la repercusión de la formulación en la estabilidad, biodistribución y funcionalidad de la molécula es un factor esencial en el diseño de fármacos basados en DNA. Recientemente, se han publicado nuevas modificaciones en las secuencias nucleotídicas (enlace 2'-O,4'-etileno; ENA) que suponen una mayor estabilidad y funcionalidad, tanto en el porcentaje de silenciamiento, como en el efecto hipoglucemiante cuando se compara con los resultados obtenidos con la misma secuencia sin modificar (61).

Se ha demostrado también la existencia de circuitos neuronales entre el hipotálamo y los tejidos periféricos —hígado y tejido adiposo— que integrarían el metabolismo energético a nivel sistémico (62). Una reciente publicación demuestra que la actividad PTP1B en neuronas regula el peso corporal, la adiposidad y la acción de la leptina (63). El estudio revela que la eliminación de PTP1B de forma específica en neuronas supone una resistencia a la obesidad inducida por dieta rica en grasas, con un efecto positivo sobre la homeostasis de la glucosa, la tasa metabólica, la insulinemia y la sensibilidad a leptina en el hipotálamo. Por tanto, si se confirmara que la PTP1B neuronal tuviera un papel en la regulación de la

sensibilidad periférica a insulina, se podría diseñar una aproximación terapéutica contra la obesidad y la diabetes de tipo II basada en el silenciamiento específico en neuronas hipotalámicas. Para ello sería necesario desarrollar herramientas de liberación al tejido neuronal y al sistema nervioso central.

Sobre-expresión de proteínas cuya deficiencia causa la patología

En los últimos años se ha venido desarrollando diversos abordajes sobre tejidos como el hígado, músculo esquelético o tejido adiposo, que en diabetes de tipo II han perdido la sensibilidad a insulina, con el objetivo de expresar, mediante vectores de expresión, aquellas proteínas que se relacionan con una mayor sensibilidad a la insulina y a la captación de glucosa.

El músculo esquelético es una diana potencial para este tipo de terapias antidiabéticas ya que constituye alrededor del 40% de la masa corporal, proporcionando una excelente accesibilidad. Además representa un tejido esencial en la captación y oxidación de glucosa y ácidos grasos tras la ingesta. Ya en 1990, John Wolf de la Universidad de Wisconsin, describió la capacidad del músculo esquelético de internalizar y expresar genes inyectados en sus células a partir de plásmidos de expresión sin vehiculización previa. La aplicación de pequeñísimas corrientes eléctricas en la fibra muscular al mismo tiempo de la inyección del DNA (electroporación) consigue aumentar, de manera muy significativa, la eficacia de transfección (64), haciendo que las perspectivas de utilización clínica sean esperanzadoras para esta estrategia terapéutica. En cuanto a vectores virales, la inyección intramuscular de vectores adenoasociados (AAV-1) resulta menos inmunogénica que con adenovirus, siendo además eficaz en la expresión a largo plazo de proteínas secretadas (65). En diabetes, la captación de glucosa en el músculo está disminuida como consecuencia de la resistencia a insulina, contribuyendo este hecho en gran medida a la hiperglucemia. Existen múltiples evidencias de que es posible incrementar la capacidad de captación de glucosa a través de la sobre-expresión de glucoquinasa en músculo ya sea mediante electroporación (66) o vectores adenovirales (67), aunque la efectividad para revertir diabetes y obesidad varía según el modelo de animal diabético utilizado. Por otro lado, la secreción de niveles basales de insulina en músculo en un ratón transgénico incrementa la captación de glucosa en músculo ya que éste es un tejido sensible a la hormona (66), aunque no corrige la hiperglucemia tras la inducción de diabetes con estreptozotocina. En un paso más allá, se ha intentado generar un sistema "sensor de glucosa", y así la expresión conjunta de insulina y de glucoquinasa en niveles basales en músculo esquelético, permite el mantenimiento de la normoglucemia, tanto en estado post-pandrial como en ayunas, posiblemente debido a un efecto sinérgico (glucoquinasa en músculo e insulina a nivel sistémico) que incrementa la captación de glucosa en músculo y disminuye la producción hepática de glucosa (68).

Por otro lado, también se ha sugerido que la potenciación de la actividad enzimática de glucoquinasa en hígado, ya sea por métodos farmacológicos o genéticos, podría ser una manera de incrementar la captación de glucosa, con un posible efecto hipoglucemiante en diabetes. Mientras que los primeros resultados parecían confirmar esta hipótesis (69), otros ponen en duda la idoneidad de esta estrategia ya sea porque la expresión a largo plazo induce resistencia a insulina y esteatosis hepática (70), o bien porque los niveles de sobre-expresión necesarios para obtener un efecto hipoglucemiante desembocan en dislipidemia (71). Sin embargo, los efectos sobre la esteatosis hepática podrían, en teoría, evitarse si la sobre-expresión de glucoquinasa se hace en la zona perivenosa del hígado, que es en la que se expresa fisiológicamente (72). Se están realizando estudios en este sentido mediante transfección específicamente perivenosa gracias a la inyección hidrodinámica (73). Además, el uso de una forma mutante de glucoquinasa (GK-A456V), con una Km para la glucosa más baja, proporciona un efecto más potente sobre la glucemia (**Figura 6**), sin dislipidemia. En humanos la GK-A456V se ha descrito ligada a hipoglucemia hiperinsulinémica en la infancia (74). Respecto a la más baja Km de la enzima, presumiblemente, la mutación, que se sitúa en el lugar de unión con la proteína reguladora de la glucoquinasa, podría reducir la eficacia en el secuestro en núcleo de la enzima.

El llamado "*glucagon-like peptide 1*" (GLP-1) es un péptido secretado por las células L del intestino en respuesta a la ingesta, que presenta una acción insulínica dependiente de glucosa y está implicado en el control de la ingesta a nivel cerebral. El GLP1 mejora la secreción de insulina dependiente de glucosa, reduce los niveles de glucosa y de la secreción post-prandial de glucagón; además, mejora la función de las células beta del páncreas y del vaciado gástrico. Su corta vida media hace que una terapia basada en la inyección de este péptido sea inviable. La expresión ectópica de GLP-1 mediante vectores adenovirales (75) proporciona, sin embargo, niveles terapéuticos de GLP-1 que se reflejan en una mejora de la homeostasis de la glucosa y en una normalización de la insulinemia en modelos animales de diabetes severa, lo que valida en cierta manera, de forma conceptual, esta aproximación terapéutica.

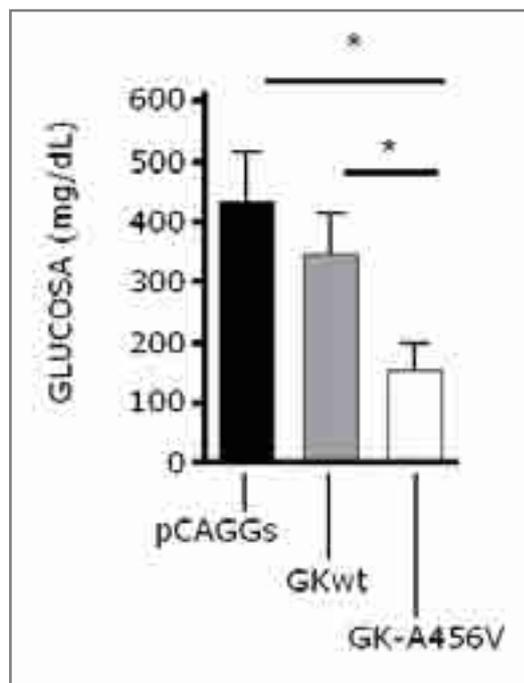


Figura 6. Efecto hipoglucemiante de la sobre-expresión de GK y GK-A456V en hígado de ratón diabético. Se inyectaron, en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, vectores de expresión control, GK y GK-A456V mediante inyección hidrodinámica. La glucemia post-prandial se determinó 48 horas después de la inyección.

En esta línea de actuación se podría especular con una estrategia similar basada en la expresión ectópica de factor neurotrófico ciliar (CNTF), neuropéptido implicado en la pérdida de peso a través del control del apetito y el incremento de la tasa metabólica, regulado todo ello en los circuitos neuronales hipotalámicos. CNTF repara la resistencia a insulina en ratones diabéticos a través de una acción directa sobre el músculo, activando la oxidación de ácidos grasos vía AMPK (76). Esto tendría implicaciones en diabetes ya que se lograría una mejora en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, es evidente que para una liberación de este tipo de péptidos de forma segura en el tejido diana de elección, se precisa todavía una mejora sustancial en el diseño de vectores para su utilización en estrategias de Terapia Génica.

Conclusiones

La diabetes es, desde un punto de vista científico, una patología dinámica. Su complejidad y los numerosos mecanismos fisiopatológicos que la definen suponen un reto importante para la terapéutica. La Terapia Génica de la diabetes, por esta razón, a parte de tener que superar las limitaciones propias de esta técnica, especialmente respecto a la optimización de vectores, además, está supeditada a los nuevos descubrimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad ya que se deben conjugar una amplia variedad de mecanismos de regulación metabólica íntimamente imbricados.

Por ello, las estrategias más sencillas y directas, como es la utilización de oligonucleótidos antisentido modificados, han supuesto una buena alternativa. Son especialmente prometedores los resultados de Pandey y colaboradores (77) que demuestran como la reducción en la expresión de una protein-tirosin-fosfatasa de bajo peso molecular normaliza la hiperglucemia y la sensibilidad a insulina. En base a estos resultados ya está en marcha un ensayo clínico de Fase II en humanos desde 2006 con muy buenos resultados.

Referencias

1. Godsland IF, Johnston DG, Chaturvedi N (2007) Mechanisms of disease: Lessons from ethnicity in the role of triglyceride metabolism in ischemic heart disease. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3: 530-8.
2. Ozanne SE, Constanca M (2007) Mechanisms of disease: The developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3: 539-46.
3. Jahromi MM, Eisenbarth GS (2007) Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci*, 64: 865-72.
4. Moscattiello S, Manini R, Marchesini G (2007) Diabetes and liver disease: An ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 17: 63-70.
5. Walker CG, Zariwala MG, Holness MJ, Sugden MC (2007) Diet, obesity and diabetes: A current update. *Clin Sci*, 112: 93-111.
6. Ahmann AJ (2007) Guidelines and performance measures for diabetes. *Am J Manag Care* 13(Suppl 2): S41-6.
7. Triplitt CL (2007) New technologies and therapies in the management of diabetes. *Am J Manag Care* 13(Suppl 2): S47-54.
8. Bresson D, von Herrath M (2007) Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes: To combine or not to combine? *Autoimmun Rev*, 6: 315-22.
9. Sicut BL, Morgan LA (2007) New therapeutic options for the management of diabetes. *Consult Pharm*, 22: 45-56.
10. Choe C, Edelman S (2007) New therapeutic options for treating type-2 diabetes: A review of insulin analogs and premixed insulin analogs. *J Natl Med Assoc*, 99: 357-60.
11. Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA (2004) Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 15: 405-13.
12. Ayuso E, Chillón M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F (2004) *In vivo* gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 15: 805-12.
13. Ayuso E, Chillón M, García F, Agudo J, Andaluz A, Carretero A, Monfar M, Moya M, Montané J, Otaegui PJ, Bosch F (2006) *In vivo* gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Mol Ther*, 13: 747-55.
14. Trucco M (2005) Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest*, 115: 5-12.
15. Meivar-Levy I, Ferber S (2006) Regenerative medicine: Using liver to generate pancreas for treating diabetes. *Isr Med Assoc J*, 8: 430-4.
16. Hutton JC (1994) Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 37(Suppl 2): S48-56.
17. Foufelle F, Ferré P (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: A role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*, 366: 377-91.
18. Rivera VM, Wang X, Wardwell S, Courage NL, Volchuk A, Keenan T, Holt DA, Gilman M, Orci L, Cerasoli F, Rothman JE, Clackson T (2000) Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science* 287: 826-30.
19. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW (2000) Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature*, 408: 483-8.
20. Meivar-Levy I, Ferber S (2003) New organs from our own tissues: Liver-to-pancreas transdifferentiation. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 460-6.
21. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L (2004) Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 2458-63.
22. Wilson ME, Scheel D, German MS (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev*, 120: 65-80.
23. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, Benvenisti-Zarum L, Meivar-Levy I, Ferber S (2003) Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*, 278: 31950-7.
24. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L (2003) Neuro D-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9: 596-603.
25. Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E, Eventov-Friedman S, Barshack I, Goldberg I, Pri-Chen S, Ben-Dor L, Polak-Charcon S, Karasik A, Shimon I, Mor E, Ferber S (2005) Cell-

- replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 7964-9.
26. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y (2005) A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes. *J Biol Chem*, 280: 15047-52.
 27. Hussain MA, Theise ND (2004) Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet* 364: 203-5.
 28. Lechner A, Yang YG, Blacken RA, Wang L, Nolan AL, Habener JF (2004) No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* 53: 616-23.
 29. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389-94.
 30. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC (2004) Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 47: 499-508.
 31. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54: 2060-9.
 32. Montolio M, Téllez N, Biarnés M, Soler J, Montanya E (2005) Short-term culture with the caspase inhibitor z-VAD.fmk reduces beta cell apoptosis in transplanted islets and improves the metabolic outcome of the graft. *Cell Transplant*, 14: 59-65.
 33. Téllez N, Montolio M, Biarnés M, Castaño E, Soler J, Montanya E (2005) Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein increases beta-cell replication in rat pancreatic islets. *Gene Ther*, 12: 120-8.
 34. Téllez N, Montolio M, Estil-Les E, Escoriza J, Soler J, Montanya E (2007) Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome. *Diabetologia* 50: 602-11.
 35. Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocaña A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I, Stewart AF (2004) Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: Reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology* 145: 467-74.
 36. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS (2005) Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435: 220-3.
 37. Glinka Y, Chang Y, Prud-Homme GJ (2006) Protective regulatory T cell generation in autoimmune diabetes by DNA covaccination with islet antigens and a selective CTLA-4 ligand. *Mol Ther*, 14: 578-87.
 38. Jun HS, Chung YH, Han J, Kim A, Yoo SS, Sherwin RS, Yoon JW (2002) Prevention of autoimmune diabetes by immunogene therapy using recombinant vaccinia virus expressing glutamic acid decarboxylase. *Diabetologia*, 45: 668-76.
 39. Li A, Ojogho O, Franco E, Baron P, Iwaki Y, Escher A (2006) Pro-apoptotic DNA vaccination ameliorates new onset of autoimmune diabetes in NOD mice and induces foxp3+ regulatory T cells *in vitro*. *Vaccine* 24: 5036-46.
 40. Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*, 86: 465-514.
 41. Uprichard SL (2005) The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett*, 579: 5996-6007.
 42. Lewis DL, Wolff JA (2005) Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Meth Enzymol*, 392: 336-50.
 43. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J (2003) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 9: 347-51.
 44. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA (2002) RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-9.
 45. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPAR-gamma coactivator-1-alpha (PGC-1): Requirement for hepatocyte nuclear factor 4-alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4012-7.
 46. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M (2003) TRB3: A tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300: 1574-7.
 47. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M (2004) PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med*, 10: 530-4.
 48. Gómez-Valadés AG, Molas M, Vidal-Alabré A, Bermúdez J, Bartrons R, Perales JC (2005) Copolymers of poly-L-lysine with serine and tryptophan form stable DNA vectors: Implications for receptor-mediated gene transfer. *J Control Release* 102: 277-91.
 49. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-8.
 50. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Kotliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-4.
 51. Manoharan M (2004) RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol*, 8: 570-9.
 52. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest*, 108: 1359-67.
 53. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 11285-90.
 54. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CV, Arden KC, Accili D (2002) Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet*, 32: 245-53.

55. Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, Meseck M, Dong HH (2006) Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology* 147: 5641-52.
56. Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, Bhanot S, McKay R, Monia B, Shutter JR, Lindberg RA, Shulman GI, Veniant MM (2006) Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 55: 2042-50.
57. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI (2005) Reversal of non-alcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 603-8.
58. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ (2005) Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 12011-6.
59. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI (2006) Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest*, 116: 817-24.
60. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169-80.
61. Koizumi M, Takagi-Sato M, Okuyama R, Araki K, Sun W, Nakai D, Tsutsumi S, Kawai K (2006) Direct comparison of *in vivo* antisense activity of ENA oligonucleotides targeting PTP1B mRNA with that of 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified oligonucleotides. *Oligonucleotides* 16: 253-62.
62. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y (2006) Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science*, 312: 1656-9.
63. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med*, 12: 917-24.
64. Aihara H, Miyazaki J (1998) Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 16: 867-70.
65. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B (2003) AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, 101: 2963-72.
66. Riu E, Mas A, Ferre T, Pujol A, Gros L, Otaegui P, Montoliu L, Bosch F (2002) Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: Insights from transgenic mice. *Diabetes* 51: 704-11.
67. Jiménez-Chillarón JC, Newgard CB, Gómez-Foix AM (1999) Increased glucose disposal induced by adenovirus-mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle *in vivo*. *FASEB J*, 13: 2153-60.
68. Mas A, Montané J, Anguela XM, Muñoz S, Douar AM, Riu E, Otaegui P, Bosch F (2006) Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55: 1546-53.
69. Desai UJ, Slosberg ED, Boettcher BR, Caplan SL, Fanelli B, Stephan Z, Gunther VJ, Kaleko M, Connelly S (2001) Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes* 50: 2287-95.
70. Ferre T, Riu E, Franckhauser S, Agudo J, Bosch F (2003) Long-term over-expression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia* 46: 1662-8.
71. O'Doherty RM, Lehman DL, Télamaque-Potts S, Newgard CB (1999) Metabolic impact of glucokinase over-expression in liver: Lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes*, 48: 2022-7.
72. Jungermann K, Kietzmann T (1996) Zonation of parenchymal and non-parenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 16: 179-203.
73. Gómez-Valadés AG, Vidal-Alabró A, Molas M, Boada J, Bermúdez J, Bartrons R, Perales JC (2006) Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther*, 13: 401-10.
74. Christesen HB, Jacobsen BB, Odili S, Buettger C, Cuesta-Munoz A, Hansen T, Brusgaard K, Massa O, Magnuson MA, Shiota C, Matschinsky FM, Barbetti F (2002) The second activating glucokinase mutation (A456V): Implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes*, 51: 1240-6.
75. Parsons GB, Souza DW, Wu H, Yu D, Wadsworth SG, Gregory RJ, Armentano D (2007) Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Ther*, 14: 38-48.
76. Watt MJ, Dzamko N, Thomas WG, Rose-John S, Ernst M, Carling D, Kemp BE, Febbraio MA, Steinberg GR (2006) CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med*, 12: 541-8.
77. Pandey SK, Yu XX, Watts LM, Michael MD, Sloop KW, Rivard AR, Leedom TA, Mancham VP, Samadzadeh L, McKay RA, Monia BP, Bhanot S (2007) Reduction of low molecular weight protein-tyrosine phosphatase expression improves hyperglycemia and insulin sensitivity in obese mice. *J Biol Chem*, 282: 14291-9. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/M609626200v1?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Pandey&fulltext=insulin+sensitivity&andexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>.

CAPÍTULO 8

Terapia Génica en hepatopatías

Juan Ruiz

La Terapia Génica es la estrategia terapéutica que busca alcanzar un efecto beneficioso en el organismo frente a una determinada enfermedad basándose en la transferencia de material genético (1). La versatilidad de esta nueva modalidad terapéutica hace que cualquier enfermedad pueda ser tratada mediante Terapia Génica y en concreto, las enfermedades del hígado que constituyen una excelente diana para este tipo de tratamiento.

Las razones que hacen del hígado un órgano especialmente susceptible a un abordaje relacionado con la Terapia Génica son fundamentalmente de tres tipos (**Figura 1**):

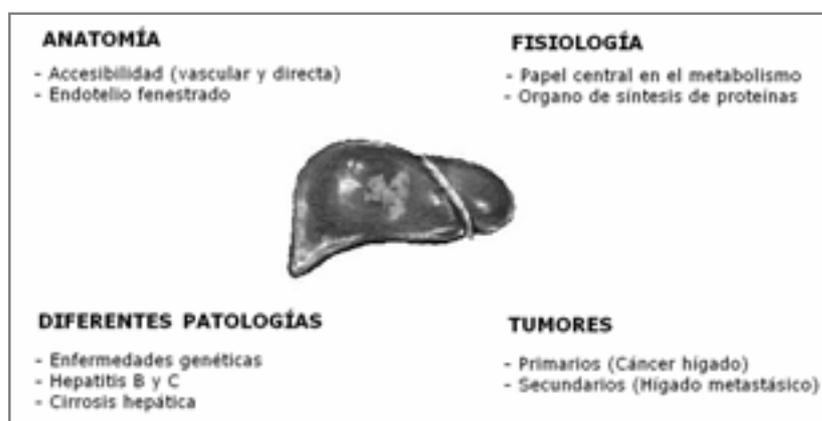


Figura 1. Las razones que hacen del hígado un órgano diana para la Terapia Génica.

- Anatómicas, por su especial accesibilidad por vía vascular (el hígado dispone de un sistema de doble circulación, que incluye sangre arterial por la arteria hepática y venosa a través de la vena porta) y el hecho de disponer de un endotelio fenestrado, que permite el contacto directo de los hepatocitos con la sangre y todos aquellos productos que ésta lleve disueltos. Ello permite que los vectores (virales o no virales) que llevan el gen terapéutico puedan llegar a los hepatocitos cuando son administrados por vía arterial o venosa.

- Fisiológicas, al tratarse el hígado de un órgano que juega un papel central en el control del metabolismo y por tanto la diana de numerosas enfermedades metabólicas y ser, además, un órgano que fabrica un gran número de proteínas fundamentales en numerosos procesos del organismo, como la albúmina, los factores de coagulación, los inhibidores de proteasas, etc).

- Patogénicas, dada la variedad e importancia de las enfermedades que afectan al hígado, en concreto la mayor parte de las enfermedades causadas por errores congénitos del metabolismo, enfermedades de tipo infeccioso con una elevada prevalencia, como las hepatitis virales causadas por los virus B y C o enfermedades tumorales frecuentes de tipo primario (carcinoma hepatocelular) o sobre todo

metastásico, dado que el hígado es uno de los órganos donde con más frecuencia asientan las metástasis de tumores de un origen muy variado.

Las enfermedades hepáticas susceptibles de tratamiento con Terapia Génica pueden agruparse de la siguiente forma:

- Enfermedades genéticas congénitas
- Enfermedades infecciosas
- Tumores primarios o secundarios
- Otras

Enfermedades hepáticas congénitas

El hígado es tanto origen como diana de numerosas enfermedades genéticas monogénicas, en las que mutaciones, deleciones, translocaciones, etc. de un gen, dan lugar a una ausencia y/o un mal funcionamiento de la proteína codificada por dicho gen, una pérdida de su función y con ello la enfermedad. La identificación de la mayor parte de los genes implicados en las enfermedades genéticas y su clonación hacen posible preparar vectores que contengan dichos genes y sea posible, al menos, desde un punto de vista teórico, introducirlos en el organismo (en el hígado, u otro órgano) para tratar de reparar el defecto.

La lista de enfermedades monogénicas con afectación hepática que han sido abordadas mediante Terapia Génica en los últimos años no ha parado de crecer. Sin ánimo de ser exhaustivo, se pueden mencionar las siguientes:

- Enfermedades genéticas con origen y daño en el hígado
 - Enfermedad de Wilson (2)
 - Deficiencia de alfa-1-antitripsina (3)
 - Tirosinemia (4)
 - Criggler Najjar y otras hiperbilirrubinemias (5)
 - Glucogenosis (6)
 - Fenilcetonuria (7)
- Enfermedades genéticas de origen hepático y daño en otros órganos
 - Hemofilia A (8)
 - Hemofilia B (9)
 - Hipercolesterolemia familiar (10)
 - Deficiencia de ornitina transcarbamilasa (11)
 - Deficiencia de lipoprotein lipasa (12)
 - Porfiria aguda intermitente (13)

Uno de los primeros protocolos clínicos llevado a cabo en los años 90 fue el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar (deficiencia del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, LDL) mediante una técnica de Terapia Génica *ex vivo* consistente en extraer quirúrgicamente un fragmento del hígado de los pacientes, cultivar los hepatocitos, hacer la transducción con el gen del receptor de la LDL mediante un retrovirus, seleccionar las células expandidas y modificadas genéticamente y reimplantar dichas células de nuevo en el hígado de los pacientes (**Figura 2**). A pesar de la complejidad del procedimiento y la importancia de la intervención quirúrgica asociada, no se produjeron complicaciones en los pacientes y fue bien tolerado (14). Sin embargo, la eficacia fue muy baja y el tratamiento se limitó a unos pocos pacientes, sin que haya vuelto a intentarse. Este ensayo puso de

manifiesto la dificultad de una estrategia que debe conseguir que la célula modificada genéticamente exprese el gen terapéutico por períodos muy prolongados (idealmente la vida eficaz de dicha célula) o que, al menos, sea posible repetir el tratamiento, una vez se pierde dicha expresión.

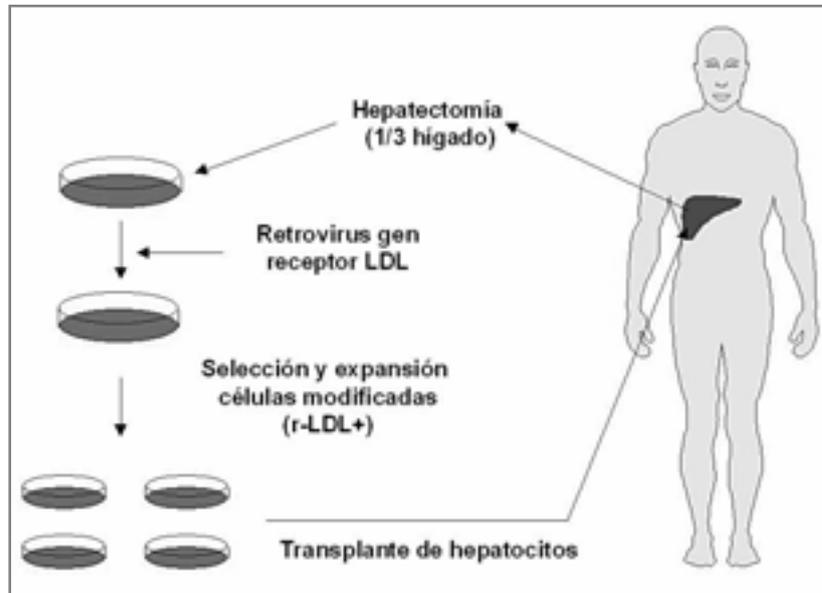


Figura 2. Esquema del primer ensayo clínico en pacientes con hipercolesterolemia familiar.

En los últimos años se han hecho avances significativos en el campo de los vectores, fundamentalmente los de tipo viral, con la introducción de los nuevos virus adenoasociados (de doble cadena o auto-complementarios) (15) o los lentivirus, que mejoran las posibilidades de conseguir una expresión génica duradera sin efectos secundarios relevantes (16). Ello nos permite ser optimistas en aquellas patologías en los que baste conseguir una corrección parcial del defecto (no sea necesario alcanzar el 100% de las células afectadas ni niveles elevados de una actividad enzimática) para corregir el fenotipo de la enfermedad. Este sería el caso de la hemofilia, en la que bastaría conseguir niveles sistémicos de factor coagulante de un 5% de los normales para mejorar significativamente el pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes. El caso es aún más llamativo en aquellas situaciones en las que la corrección del defecto proporciona a las células modificadas genéticamente una ventaja competitiva, que les permite sobrevivir y repoblar el hígado enfermo, como sería el caso de la tirosinemia (17).

Por otro lado, la comprensión de los mecanismos de silenciamiento genético y del control celular sobre la expresión génica han permitido sustituir los promotores virales que se utilizaban en un principio por otros menos potentes, lo que permite una mayor capacidad de expresión a largo plazo, y por ello más indicados en el tratamiento de enfermedades genéticas congénitas.

Enfermedades infecciosas del hígado

La hepatitis B y C son enfermedades virales de alta prevalencia que con frecuencia cronican y dan lugar a una hepatitis crónica que con el tiempo puede evolucionar hacia la

cirrosis hepática y en algunos casos al carcinoma hepatocelular. El tratamiento de estas infecciones virales no es del todo satisfactorio, puesto que un elevado porcentaje de los pacientes no responde al tratamiento o responde inicialmente pero solamente hasta que el virus se hace resistente y recidiva con el tiempo. Por este motivo se siguen buscando nuevas estrategias terapéuticas entre las que destacan las basadas en la transferencia genética (18). Esta puede estar dirigida a inducir o potenciar la respuesta inmune del huésped frente al virus o a interferir alguna fase de su ciclo biológico, consiguiendo un efecto antiviral directo.

Immunoterapia (vacunación) génica

La transferencia de genes puede tener por objetivo la inducción y/o potenciación de una respuesta inmune del huésped frente al virus, en lo que puede describirse como una especie de "vacunación génica", que a su vez puede ser preventiva o terapéutica. Se utilizan para ello genes que codifican antígenos del agente patógeno, genes de citoquinas con propiedades inmunomoduladoras (por ejemplo la interleuquina 12) o la combinación de ambos. La **Figura 3** describe como se produce la inducción de una respuesta inmunitaria mediante la transferencia de genes.

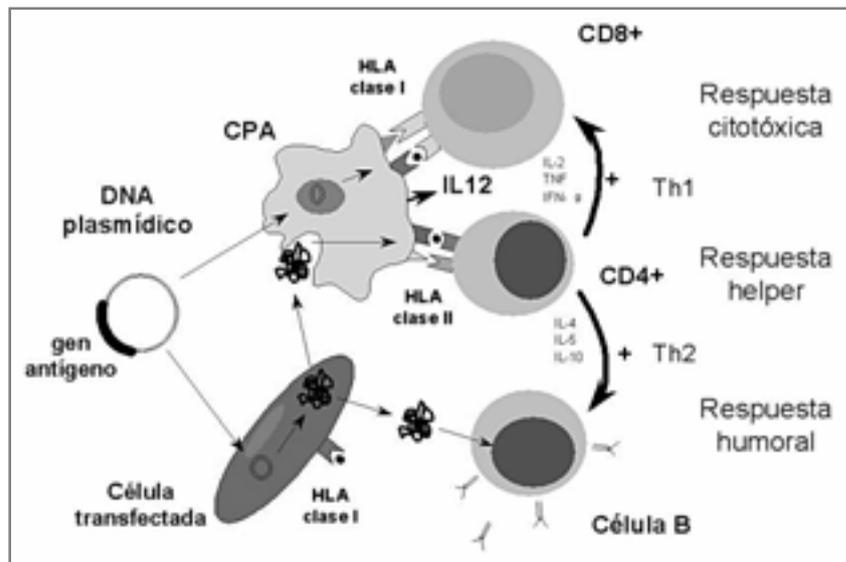


Figura 3. Inducción de respuesta inmunitaria mediante transferencia génica.

Esta transferencia de genes con objeto de producir respuestas inmunológicas se puede llevar a cabo mediante la inyección directa en el paciente del vector que lleve los genes mencionados anteriormente, o puede llevarse a cabo *in vitro*, en una estrategia *ex vivo* que combinaría la Terapia Génica con las técnicas de Terapia Celular. Es posible mejorar la selectividad del proceso y el nivel de control y eficacia del procedimiento (a costa lógicamente de una mayor complejidad y coste económico) transfiriendo *in vitro* los genes de antígenos y/o citoquinas a células especializadas del sistema inmune (por ejemplo células dendríticas diferenciadas en cultivo) (19).

La utilización de vacunas genéticas tiene la ventaja de que una vez conseguida la inducción de una respuesta inmune frente al agente patógeno, el propio sistema inmune se encarga de amplificar el efecto, por lo que no son necesarios niveles elevados de expresión del gen o prolongados en el tiempo; además, el número de vectores con la capacidad de conseguir este efecto es elevado. La posibilidad ya mencionada de combinar los genes de los

antígenos, con genes de citoquinas inmunopotenciadoras o de combinar Terapia Génica y Terapia Celular (técnicas *ex vivo*), son también importantes ventajas asociadas a esta estrategia (20).

Los inconvenientes de la inmunoterapia génica están relacionados con la capacidad de los virus de interferir con la respuesta inmunitaria del paciente, capacidad que han desarrollado evolutivamente como medio de supervivencia y que en el caso de virus como los de la inmunodeficiencia adquirida o de los propios virus de la hepatitis B y C han alcanzado niveles de eficacia muy elevados. Ejemplo de este tipo de interferencias es el bloqueo de una respuesta inmunitaria celular eficaz mediante la estimulación por parte del virus de las células T reguladoras (21).

Este tipo de vacunas génicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, terapéuticas o preventivas, se han utilizado clínicamente en el contexto de enfermedades tumorales (en el que se han empleado genes que expresan antígenos tumorales) o en la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida, pero no en el campo de las infecciones por los virus de la hepatitis B y C, donde solamente se ha experimentado en modelos animales.

Terapia Génica antiviral directa

El conocimiento del ciclo biológico de los virus, en concreto de los virus de la hepatitis B y C, permite diseñar un tratamiento basado en la transferencia de un material genético (que exprese o no una proteína) cuyo objetivo sea el de bloquear un determinado paso de dicho ciclo biológico. En la **Figura 4** se resumen, de forma esquemática, los ciclos biológicos de los virus B y C en el hepatocito y los niveles en los que se podría actuar, así como algunas de las estrategias que se podrían utilizar para ello.

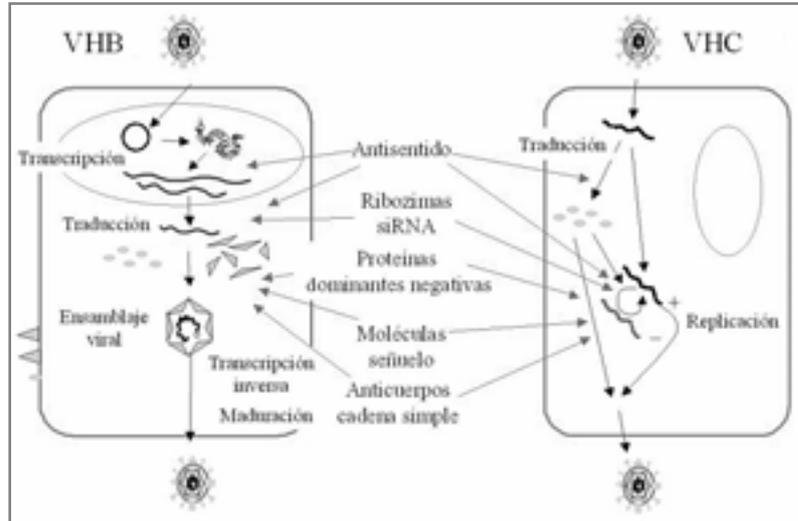


Figura 4. Ciclos replicativos de los virus B y C y posibilidades de la Terapia Génica antiviral directa.

Así, es posible desde un punto de vista teórico y en modelos *in vitro* y en algún caso *in vivo*, bloquear la replicación del DNA o su expresión a RNA mensajero mediante moléculas antisense; también se puede destruir o bloquear la función del RNA mensajero (y con ello la traducción a proteínas virales) mediante moléculas antisense, ribozimas o más recientemente, siRNA (RNAs de silenciamiento) (23); por último, se puede bloquear el ensamblaje de nuevas partículas virales mediante el uso de moléculas señuelo ("*decoys*"),

proteínas dominantes negativas, o con anticuerpos intracelulares (también llamados anticuerpos de cadena simple o "*single chain antibodies*") (18).

Este tipo de estrategias han demostrado en algunos casos niveles de eficacia antiviral *in vitro* e *in vivo* muy elevados, como es el caso de los siRNA (22-24), y tienen, además, la ventaja de que se pueden combinar con cualquier otro tipo de fármacos antivirales o inmunomoduladores. Sin embargo, presentan el gran inconveniente de que para alcanzar un efecto terapéutico significativo se han de transfectar la mayor parte —si no la totalidad— de los hepatocitos (algo que todavía no está al alcance de los vectores disponibles), así como mantener la expresión durante el tiempo necesario para aclarar el virus antes de que desarrolle resistencias —esta es la razón por la que tiene interés la combinación con otros agentes, antivirales o no—.

Enfermedades tumorales del hígado

El tratamiento tanto del hepatocarcinoma, como de las metástasis hepáticas ha sido una de las áreas donde más se ha trabajado en el desarrollo de la Terapia Génica aplicada a las enfermedades hepáticas (25).

Las estrategias empleadas son las que se están desarrollando, en general, para otro tipo de tumores:

- Quimioterapia génica: Consiste en la introducción en la célula tumoral de un gen que es tóxico, de forma que su expresión lleva a la muerte de ésta (26). La expresión del gen tóxico (muchas veces conocido como gen suicida) puede ser constitutiva, por lo que se expresará también en células no tumorales y puede acompañarse de efectos tóxicos secundarios o puede estar regulada por un promotor selectivo del tumor o que sea inducible (por ejemplo por la toma de doxiciclina), lo que permitiría limitar la expresión en un tejido o en el tiempo.

- Inmunoterapia: Como se ha comentado previamente para el caso del tratamiento de las infecciones virales del hígado, la transferencia de genes de antígenos tumorales conocidos, de citoquinas inmunopotenciadoras o su combinación, puede vencer la tolerancia que existe frente a las células tumorales, inducir una respuesta inmunitaria y conseguir un efecto antitumoral (27).

- Terapia antiangiogénica: Es posible conseguir un bloqueo de la formación de los nuevos vasos que el tumor necesita para su crecimiento, mediante la transferencia de genes con propiedades antiangiogénicas, como la interleuquina 12 (28).

- Viroterapia: Esta estrategia se basa en la transferencia de los llamados virus oncolíticos, que son virus modificados genéticamente que solo son capaces de replicarse en células tumorales, en las que la sobreexpresión de un determinado gen (un oncogén), complementa el defecto genético que poseen. Al replicarse, los virus destruyen la célula, alcanzándose el efecto terapéutico (29).

- Transferencia de genes supresores: El desarrollo de los tumores se produce por el escape de la célula tumoral a los mecanismos de control del ciclo celular. Existe un gran número de genes implicados en dicho control, que cuando sufren alteraciones en su nivel de expresión, bien por sobreexpresión (oncogenes) o bien por su inhibición (genes supresores) pueden contribuir al desarrollo del tumor. La estrategia opuesta, es decir, el bloqueo de la función de los oncogenes o la introducción de los genes supresores de

tumores ha demostrado su eficacia tanto en modelos animales *in vitro*, como *in vivo* (30).

Otras hepatopatías

Además de las mencionadas anteriormente, la Terapia Génica puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades crónicas del hígado como la cirrosis hepática, mediante la transferencia de genes antifibróticos o los correspondientes factores deficitarios durante la enfermedad, como el IGF-I (31); también se puede utilizar para mejorar el resultado de un trasplante hepático mediante la transferencia de genes de citoquinas inmunosupresoras o con capacidad de interferir en el sistema de presentación antigénica.

Consideraciones sobre vectores, rutas de administración de los mismos y modelos animales

La experiencia que se ha ido acumulando en cerca de 20 años de desarrollo de la Terapia Génica permite afirmar que no existe un único vector ideal que sirva para todas las posibles indicaciones, sino que en función de criterios tales como la duración de la expresión del gen terapéutico o el nivel de expresión a alcanzar, se debe escoger uno u otro. De forma orientativa, podemos establecer para las hepatopatías los siguientes criterios:

- Corta duración y alto nivel de expresión del transgén (adenovirus de primera generación)
- Larga duración y alto nivel de expresión del transgén (adenovirus de alta capacidad)
- Larga duración y nivel medio-bajo de expresión del transgén (virus adenoasociados, lentivirus, virus SV40)
- Actividad oncolítica (adenovirus replicativos condicionales)

Respecto a la vía de administración para alcanzar el hígado, como se ha comentado al principio del capítulo, el hígado es un órgano privilegiado en este sentido, dado que existen varias posibilidades. Así, podemos recurrir a la administración sistémica por vía venosa periférica, por la vena porta o por la arteria hepática (en los dos últimos casos, se haría mediante cateterismo); también se puede recurrir a la administración por vía circulatoria, con aislamiento del hígado y a la inyección intrahepática directa mediante control ecográfico (32).

Antes de aplicar un nuevo protocolo de Terapia Génica en humanos, sean éstos voluntarios sanos o pacientes, es preciso contar con datos de eficacia del posible tratamiento en un modelo animal que reproduzca lo más fielmente posible la enfermedad. A continuación se describen dos ejemplos de cómo hacer el abordaje en animales para la hepatitis B y el carcinoma hepatocelular.

Tratamiento de la hepatitis B en el modelo de la marmota

La marmota constituye el mejor modelo animal disponible para la hepatitis B. Ambos virus (el de la marmota y el humano) pertenecen a la misma familia de los Hepadnavirus, y comparten estructura genómica y ciclo biológico. De hecho, la infección por el virus de la hepatitis B de la marmota produce en ésta una enfermedad similar a la del virus B en el hombre, con el desarrollo de hepatitis crónica y a largo plazo hepatocarcinoma (33).

En este ejemplo, el tratamiento se enmarca en el campo de la inmunoterapia génica y está basado en la administración de un adenovirus de alta capacidad (adenovirus “*gutless*”) que porta los genes que codifican las dos cadenas de la interleuquina 12 (IL12) de la marmota. Las características del vector son las siguientes (**Figura 5**):

- Uso de un adenovirus de alta capacidad, que ha sido vaciado de los genes propios del adenovirus, por lo que no es inmunogénico y permite la expresión del gen terapéutico a largo plazo.
- Utilización de un promotor regulable, inducible por mifepristona (RU486), que permite controlar la expresión de la IL12 y estimularla solamente cuando se administra este fármaco. La administración repetida del mismo puede conseguir que los niveles de IL12 sean estables. La ventaja es que si se retira la RU486 cesa la producción de IL12 y se evitan, por tanto, posibles efectos secundarios a largo plazo.

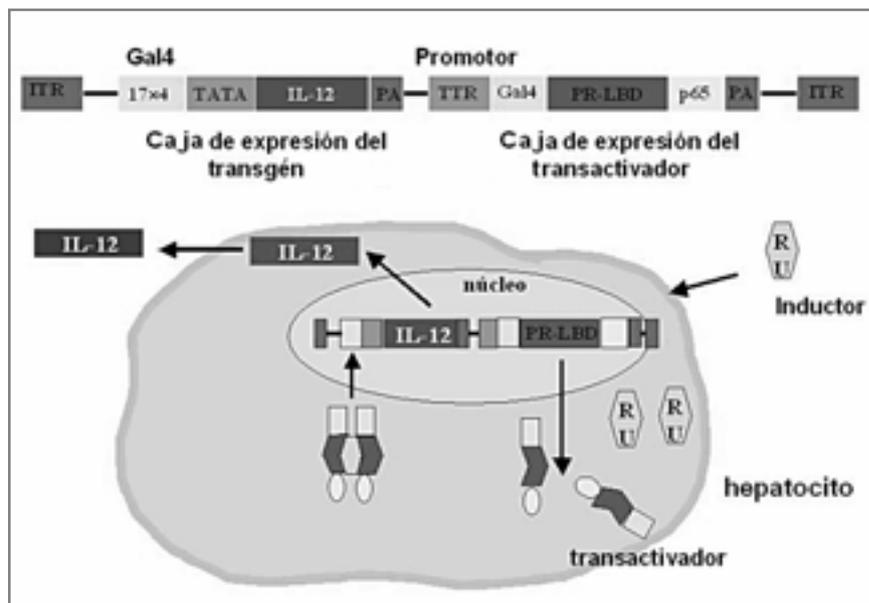


Figura 5. Esquema del adenovirus de alta capacidad con promotor regulable y los genes de la interleuquina 12. Representación del sistema de inducción de la expresión de IL12 por RU486.

El uso de IL12 como gen terapéutico tiene que ver con su capacidad de inducir una potente respuesta inmunitaria celular, respuesta que está ausente en pacientes con infección crónica por el virus B.

En el estudio, se administraron por vía intrahepática 10^{10} partículas infecciosas del adenovirus HC-Ad-RU-IL12 y 11 días después, se llevó a cabo la inducción de la expresión de IL12 mediante la administración de 12 dosis de RU (500 μ g/kg), en intervalos de 3 días. En los animales se midió la viremia y se analizó el efecto en el hígado mediante biopsia hepática.

En el análisis preliminar, se observó que el nivel de expresión de IL12 obtenido variaba entre animales, probablemente en relación con un distinto nivel de transducción inicial (pendiente de evaluar), mientras que el efecto terapéutico observado (disminución significativa de los niveles de viremia) estaba relacionado con los niveles de viremia basal,

consiguiéndose importantes reducciones de viremia en aquellos casos en que la viremia previa estaba por debajo de 10^{10} genomas virales/mL (datos no publicados).

Tratamiento del carcinoma hepatocelular mediante inmunoterapia con la expresión regulada de IL12

La misma estrategia previamente descrita para el tratamiento de la hepatitis B de la marmota, se ha empleado en un modelo murino de metástasis hepáticas de cáncer de colon, utilizando un vector similar al descrito anteriormente, un adenovirus de alta capacidad que expresa IL12 murina bajo el control de un promotor inducible mediante RU486 (34).

Los estudios de inducción de la expresión de IL12 demostraron que la inyección de RU486 cada 24 horas era capaz de inducir niveles estables de IL12 en suero, incluso 14 semanas después de la inyección del vector (**Figura 6**). Este tratamiento es capaz de permitir la supervivencia de los animales, de forma dosis dependiente, con respecto a la dosis de adenovirus (**Figura 7**).

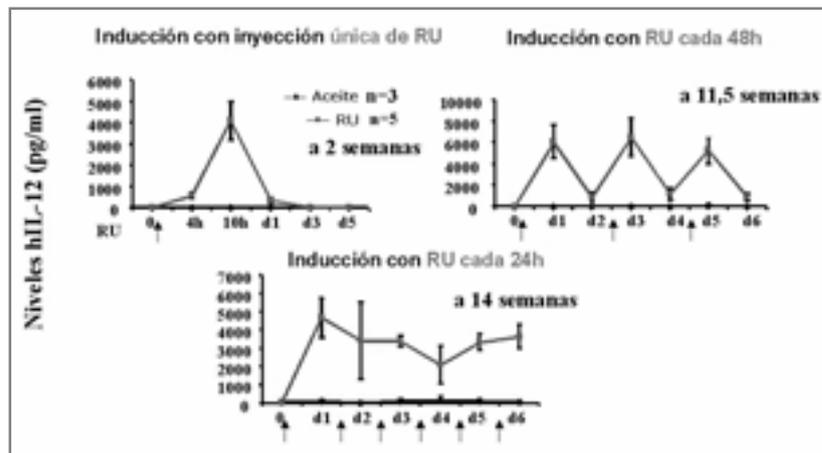


Figura 6. Resultados de la inducción de la expresión de IL12 en ratas transducidas con un adenovirus de alta capacidad y promotor regulable controlado por RU486.

Experiencia clínica en ensayos de Terapia Génica

El grupo de Terapia Génica de Jesús Prieto de la Clínica Universitaria de Navarra y de la Universidad de Navarra, ha llevado a cabo en los últimos 5 años cuatro ensayos clínicos en los que se han empleado dos vectores adenovirales recombinantes defectivos de primera generación:

- Un adenovirus recombinante defectivo que expresaba el gen de la timidina quinasa del virus Herpes simplex y un gen suicida que elimina las células tumorales cuando éstas captan ganciclovir que se convierte en ganciclovir trifosfato. Este vector se empleó en dos ensayos clínicos, uno dirigido al tratamiento de pacientes con carcinoma hepatocelular y otro dirigido al tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas.
- Un adenovirus recombinante defectivo que expresaba los genes de las dos cadenas de la IL12 y que se utilizó en un ensayo de tratamiento *in vivo* de tumores gastrointestinales (administración intratumoral en tumores primarios de hígado,

páncreas y metástasis hepáticas de cáncer de colon) y en otro de tratamiento *ex vivo* de tumores gastrointestinales mediante la modificación *in vitro* de células dendríticas del paciente y su posterior reperusión intrahepática.

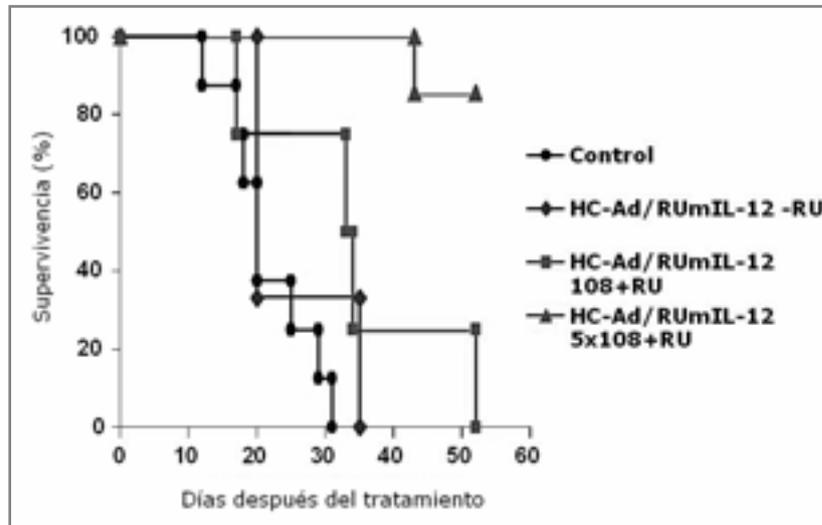


Figura 7. Resultados de supervivencia en animales con metástasis hepáticas de cáncer de colon, tratados mediante la administración sistémica de un adenovirus de alta capacidad y promotor regulable por RU486.

El resultado de estos ensayos ha sido muy satisfactorio, dado que se observaron en algún caso respuestas antitumorales parciales; además, el procedimiento fue muy seguro y no se produjeron efectos secundarios de importancia (35,36). Además, se consiguió demostrar mediante tomografía de emisión de positrones (PET), por primera vez en pacientes, que la inyección intratumoral de un adenovirus es capaz de infectar el tumor y dar lugar a la expresión del gen terapéutico (37).

Referencias

1. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-32.
2. Meng Y, Miyoshi I, Hirabayashi M, Su M, Mototani Y, Okamura T, Terada K, Ueda M, Enomoto K, Sugiyama T, Kasai N (2004) Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochim Biophys Acta* 1690: 208-19.
3. Kolb M, Martin G, Medina M, Ask K, Gaudie J (2006) Gene therapy for pulmonary diseases. *Chest* 130: 879-84.
4. Overturf K, Al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Tanguay R, Lieber A, Kay M, Grompe M (1997) Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther*, 8: 513-21.
5. van der Wegen P, Louwen R, Imam AM, Buijs-Offerman RM, Sinaasappel M, Grosveld F, Scholte BJ (2006) Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Mol Ther*, 13: 374-81.
6. Ellinwood NM, Vite CH, Haskins ME (2004) Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med*, 6: 481-506.
7. Harding CO, Gillingham MB, Hamman K, Clark H, Goebel-Daghighi E, Bird A, Koeberl DD (2006) Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther*, 13: 457-62.
8. Sarkar R, Mucci M, Addya S, Tetreault R, Bellinger DA, Nichols TC, Kazazian HH Jr. (2006) Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia A dogs and mice. *Hum Gene Ther*, 17: 427-39.
9. Brunetti-Pierri N, Nichols TC, McCorquodale S, Merricks E, Palmer DJ, Beudet AL, Ng P (2005) Sustained phenotypic correction of canine hemophilia B after systemic administration of helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 16: 811-20.
10. Leberherz C, Gao G, Louboutin JP, Millar J, Rader D, Wilson JM (2004) Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *J Gene Med*, 6: 663-72.

11. Moscioni D, Morizono H, McCarter RJ, Stern A, Cabrera-Luque J, Hoang A, Sanmiguel J, Wu D, Bell P, Gao GP, Raper SE, Wilson JM, Batshaw ML (2006) Long-term correction of ammonia metabolism and prolonged survival in ornithine transcarbamylase-deficient mice following liver-directed treatment with adeno-associated viral vectors. *Mol Ther*, 14: 25-33.
12. Rip J, Nierman MC, Sierts JA, Petersen W, Van den Oever K, Van Raalte D, Ross CJ, Hayden MR, Bakker AC, Dijkhuizen P, Hermens WT, Twisk J, Stroes E, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA, Meulenberg JM (2005) Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application. *Hum Gene Ther*, 16: 1276-86.
13. Johansson A, Nowak G, Moller C, Blomberg P, Harper P (2004) Adenoviral-mediated expression of porphobilinogen deaminase in liver restores the metabolic defect in a mouse model of acute intermittent porphyria. *Mol Ther*, 10: 337-43.
14. Raper SE, Grossman M, Rader DJ, Thoene JG, Clark BJ 3rd, Kolansky DM, Muller DW, Wilson JM (1996) Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg*, 223: 116-26.
15. Grieger JC, Samulski RJ (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 99: 119-45.
16. Loewen N, Poeschla EM (2005) Lentiviral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 99: 169-91.
17. Grompe M (1999) Therapeutic liver repopulation for the treatment of metabolic liver diseases. *Hum Cell*, 12: 171-80.
18. Gonzalez-Aseguinolaza G, Crettaz J1, Ochoa L, Otano I, Aldabe R, Paneda A (2006) Gene therapy for viral hepatitis. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6: 1263-78.
19. Xiang M, Eisenbach C, Lupu CM, Ernst E, Stremmel W, Encke J (2006) Induction of antigen-specific immune responses in vivo after vaccination with dendritic cells transduced with adenoviral vectors encoding hepatitis C virus NS3. *Viral Immunol*, 19: 210-9.
20. Garcia-Navarro R, Blanco-Urgoiti B, Berraondo P, Sanchez de la Rosa R, Vales A, Hervás-Stubbs S, Lasarte JJ, Borrás F, Ruiz J, Prieto J (2001) Protection against woodchuck hepatitis virus (WHV) infection by gene gun coimmunization with WHV core and interleukin-12. *J Virol*, 75: 9068-76
21. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J (2002) Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol*, 76: 5062-70.
22. Grimm D, Kay MA (2006) Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Ther*, 13: 563-75.
23. Smolic R, Volarevic M, Wu CH, Wu GY (2006) Potential applications of siRNA in hepatitis C virus therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 7: 142-6.
24. Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV (2005) Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 773-8.
25. Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2006) Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol*, 12: 6085-97.
26. Niculescu-Duvaz I, Springer CJ (2005) Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol*, 30: 71-88.
27. Qian C, Liu XY, Prieto J (2006) Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach. *Cell Res*, 16: 182-8.
28. Isayeva T, Kumar S, Ponnazhagan S (2004) Anti-angiogenic gene therapy for cancer (review). *Int J Oncol*, 25: 335-43.
29. Nettelbeck DM (2003) Virotherapeutics: Conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis. *Anticancer Drugs* 14: 577-84.
30. Roth JA (2006) Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 55-61.
31. Dai WJ, Jiang HC (2001) Advances in gene therapy of liver cirrhosis: A review. *World J Gastroenterol*, 7: 1-8.
32. Crettaz J, Berraondo P, Mauleon I, Ochoa L, Shankar V, Barajas M, van Rooijen N, Kochanek S, Qian C, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R, Gonzalez-Aseguinolaza G (2006) Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatology* 44: 623-32.
33. Tennant BC, Gerin JL (2001) The woodchuck model of hepatitis B virus infection. *ILAR J*, 42: 89-102.
34. Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Shankar V, Zabala M, Kochanek S, Sangro B, Kramer MG, Prieto J, Qian C (2004) Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: a potential therapy for liver cancer. *Gastroenterology* 126: 278-89.
35. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olague C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J (2004) Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol*, 22: 1389-97.
36. Mazzolini G, Alfaro C, Sangro B, Feijoo E, Ruiz J, Benito A, Tirapu I, Arina A, Sola J, Herraiz M, Lucena F, Olague C, Subtil J, Quiroga J, Herrero I, Sadaba B, Bendandi M, Qian C, Prieto J, Melero I (2005). Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol*, 23: 999-1010.
37. Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF, Sangro B, Marti-Climent J, Ruiz M, Ruiz J, Satyamurthy N, Qian C, Barrio JR, Phelps ME, Richter JA, Gambhir SS, Prieto J (2005) Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients. *Gastroenterology* 128: 1787-95.

CAPÍTULO 9

Anemia de Fanconi. Su tratamiento por la transferencia de genes

María Sagaseta, Teresa Molins, Silvia Souto y Javier Molina

La Terapia Génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos en un tejido para prevenir, inhibir o revertir un proceso patológico, es decir, con fines terapéuticos. En la Terapia Génica somática las modificaciones se realizan en células somáticas que quedan confinadas al paciente mientras que en la Terapia Génica de línea germinal las modificaciones se introducen en células que dan lugar a gametos y por lo tanto pasan a las siguientes generaciones. La modificación en línea germinal no se admite por ley.

En capítulos anteriores ya se han explicado detalladamente los mecanismos de transferencia génica tanto *ex vivo* como *in vivo*, los distintos vectores y los distintos tipos de células diana que muy bien se pueden aplicar y de hecho se aplican en los protocolos de Terapia Génica que se están ensayando para la Anemia de Fanconi.

Anemia de Fanconi

La Anemia de Fanconi (AF) es una grave enfermedad que fue descrita en el año 1927 por *Guido Fanconi*, pediatra suizo (**Figura 1**) (1). La AF es un síndrome hereditario que predispone al cáncer y es causado por mutaciones en la vía de reparación del DNA incluyendo al menos 12 genes: *Fanca*, *Fancc*, *Brca2/Fancc1*, *Fancc2*, *Fance*, *Fanccf*, *Fanccg*, *Brip1/Bach1/Fanccj*, *Fancc1*, *Fanccm* y *Fancc1*, todos ellos clonados excepto el *Fancc1* (2). Esta variabilidad en mutaciones se ha determinado por ensayos de complementación dando lugar a los llamados "Grupos de Complementación" que son 12. La distribución de estos grupos varía con relación a las circunstancias geográficas y demográficas. Así en España su distribución se muestra en la **Figura 2**. El curso clínico de la enfermedad está caracterizado por un progresivo fallo medular que compromete la vida y que predispone en alta incidencia a leucemia mieloide aguda y a tumores sólidos.



Figura 1. Guido Fanconi (1892-1979).

Las manifestaciones clínicas son muy heterogéneas pudiendo presentar anomalías esqueléticas muy diversas al nacimiento y malformaciones o anomalías en prácticamente cualquier órgano. El diagnóstico se realiza confirmando la fragilidad cromosómica en linfocitos del paciente tratándolos con agentes químicos tales como el diepoxibuteno (DEB) o la mitomicina C (MMC), que producen entrecruzamientos entre las cadenas del DNA. En

estas condiciones los linfocitos de estos pacientes se rompen mientras que los cromosomas de células normales son más estables. Si la sospecha es alta y la fragilidad cromosómica no puede confirmarse con esta técnica puede resultar conveniente realizar pruebas complementarias sobre fibroblastos en piel. La esperanza de vida queda reducida a 20 años en los pacientes con la enfermedad severa y normalmente no más de cinco décadas a aquellos pacientes con enfermedad moderada. El 80% de los pacientes ha desarrollado un fallo medular antes de los 40 años, el 15% una leucemia no linfoblástica aguda y el 10 % un tumor sólido. La única opción de tratamiento en este momento es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos a ser posible en el caso de la AF a partir de un hermano HLA-compatible ya que los trasplantes de donantes no relacionados no han dado buenos resultados. En este momento la Terapia Génica es un reto y es donde están puestas todas las esperanzas del tratamiento de esta enfermedad.

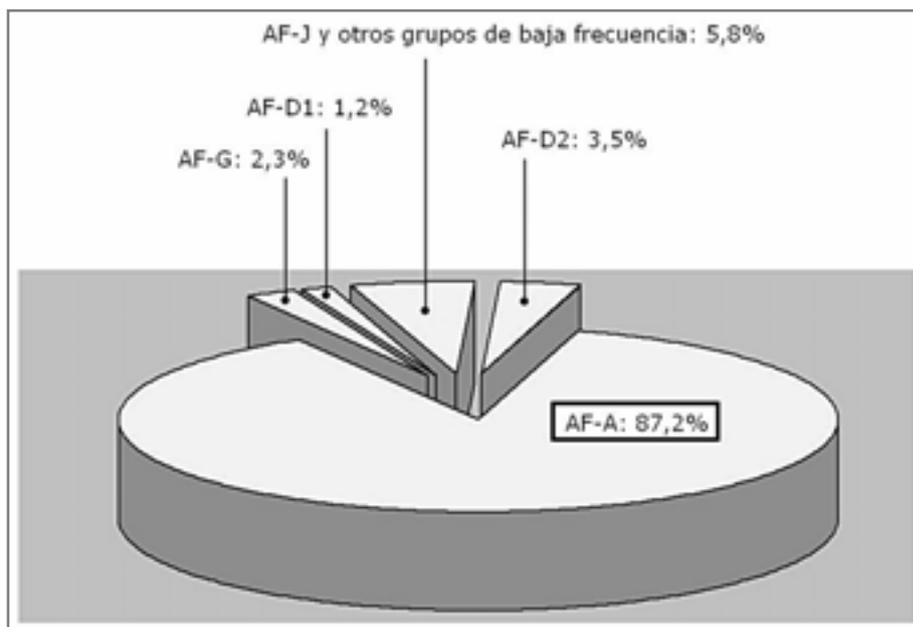


Figura 2. Distribución en España de los "Grupos de Complementación" para la Anemia de Fanconi.

La AF es una rara afectación hereditaria, autosómica recesiva caracterizada por anomalías en el desarrollo, fallo de la médula ósea y predisposición a enfermedades malignas sobre todo leucemia no linfoblástica aguda. Algunos enfermos tienen defectos físicos habitualmente referidos al sistema esquelético y nefrológico. El mayor problema es la anemia aplásica. Aunque el trasplante de progenitores hematopoyéticos es la terapéutica de elección, solo una minoría tiene un hermano histocompatible como donante. Unos pocos casos se han curado con trasplante de médula ósea de donante no emparentado pero los riesgos son muy altos. La mortalidad relacionada con el trasplante alogénico de hermano puede llegar al 25-30% y esta relación aumenta con los donantes no relacionados. Otros tratamientos incluyen hormonas masculinas, corticosteroides y factores de crecimiento hematopoyético que incrementan las cifras de células sanguíneas, pero de forma temporal por lo que no son eficaces a largo plazo.

Terapia Génica aplicada al tratamiento de la Anemia de Fanconi

En AF se ha descrito una Terapia Génica natural que ha logrado reversiones a mosaicismos porque no es de extrañar que, teóricamente, una sola célula hematopoyética pueda revertir el fenotipo hematopoyético de la AF (3). La reversión somática observada en un 25% de pacientes con Anemia de Fanconi queda evidenciada por un mosaicismo espontáneo que se manifiesta por la presencia de dos subpoblaciones de linfocitos, una hipersensible a los agentes de entrecruzamiento de DNA, como la MMC, y otra con normalidad de respuesta

ante dichos agentes (4). Las bases moleculares para esta reversión fenotípica no han sido determinadas. En estos pacientes los síntomas hematológicos eran moderados a pesar de la edad entre 9 y 30 años. Esto tiene implicaciones muy importantes respecto a la biología de las células hematopoyéticas humanas y las perspectivas de Terapia Génica en AF. En 2006, Mankad y colaboradores describen dos casos de Terapia Génica natural en dos gemelas afectas de AF (5). En un primer momento fueron diagnosticadas de Síndrome tipo-Fanconi porque aunque cumplían muchos requisitos de la AF no presentaban alteraciones hematológicas y los linfocitos de sangre periférica no tenían respuesta anómala a los agentes de entrecruzamiento del DNA. Pertenecían al grupo de complementación AF-A. La severidad de los hallazgos no hematológicos y los estudios de expresión de los alelos mutantes *in vitro*, demostraron la esperada pérdida de función del gen *Fancc*. El hallazgo de una hematopoyesis normal era debido a una mutación adquirida compensatoria en células hematopoyéticas. Ambas gemelas presentaban el mismo cambio en una única base en el DNA linfoide, mieloide y eritroide. No se encontraron alteraciones adicionales específicas del DNA sanguíneo. La repoblación por células maternas heterocigotas fue descartada. Estas observaciones podían explicarse de dos maneras. Primero, la reversión pudo ocurrir independientemente en ambas gemelas en una edad temprana tras una situación de fuerte estrés selectivo a nivel de las células madre que se tradujo en una normalidad de la hematopoyesis durante más de 28 años. La segunda y más probable explicación, es que la reversión ocurrió de forma prenatal en una única célula madre hematopoyética dando lugar a un injerto en ambas pacientes a través de la vía de circulación compartida conocida que existe entre gemelos monocigotos. La presencia de múltiples reversiones independientes rara vez se ha visto en otros casos de mosaicismo. Además, la normalización hematopoyética espontánea durante más de dos décadas tampoco ha sido descrita. No parece muy probable que la reversión ocurra en el compartimento de células madres múltiples veces de manera independiente en distintas células del mismo paciente. Independientemente del mecanismo de reversión está claro que muy pocas células revertidas son responsables de la hematopoyesis durante períodos muy prolongados de tiempo. En cuanto al potencial para la Terapia Génica, este caso de Terapia Génica natural sugiere que las células genéticamente corregidas pueden prevenir y corregir las anomalías hematológicas características de esta enfermedad.

Aquí las células hematopoyéticas funcionalmente normales fueron seleccionadas espontáneamente sin estrés externo mielo-ablativo. Además la corrección de unas muy pocas células, repueblan a largo plazo y pueden ser suficientes para tener efecto terapéutico al cabo del tiempo. Este tiempo necesario para la selección natural *in vivo* de células madre hematopoyéticas no se conoce. Puede ser un proceso lento que necesite años. Sin embargo, sí se ha comunicado una selección lenta, no mielo-ablativa de células corregidas en Terapia Génica en ratones *Fancc* que podría utilizarse para acelerar este proceso y evitar el posible inicio de fallo medular y la aparición de alteraciones en el cariotipo, presagio de una transformación maligna. Además, una vez establecido el fallo hematopoyético es muy complicada la repoblación de una médula de AF.

En modelos murinos y células humanas *in vitro* la Terapia Génica corrige el fenotipo celular de la AF sugiriendo que esta enfermedad es una candidata idónea para ser tratada con transferencia génica *ex vivo* (6,7). En primer lugar, este síndrome tiene un pronóstico muy sombrío cuya única terapéutica disponible es el trasplante alogénico de médula ósea con su inherente morbi-mortalidad. En segundo lugar, las células corregidas deben de tener una ventaja selectiva sobre las células defectuosas tal y como queda sugerido por la alta incidencia de mosaicismo en pacientes. En tercer lugar, la deficiencia en la vía de reparación del DNA en estos pacientes está específicamente referida al compartimento de las células madre hematopoyéticas. La corrección genética de los progenitores humanos de AF ha resultado ser un desafío importante. Sin embargo las características específicas de la enfermedad hacen que la aplicación de los vectores virales presente mucha dificultad técnica. Actualmente, existen múltiples ensayos en marcha para desarrollar una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de esta enfermedad incluidos ensayos en Fase I (8).

Hasta la fecha se han identificado 12 genes que dan lugar a 12 grupos de complementación diferentes (2). Esto quiere decir que nos encontramos con, al menos, 12 enfermedades distintas aunque con síntomas y consecuencias parecidas. El diseño de la Terapia Génica debe ser individualizado para cada defecto genético por lo que se habla de 12 diseños diferentes. Todo ello habla de la complejidad de este tratamiento y justifica los lentos avances que tienen lugar. La progresiva clonación de los genes de la AF está facilitando el desarrollo de modelos experimentales de AF basados en la disrupción dirigida de estos genes. Hasta el momento los ensayos clínicos basados en vectores oncorretrovirales han resultado muy descorazonadores. La principal razón para esto parece ser la fragilidad de los progenitores humanos hematopoyéticos en AF, su incapacidad para el crecimiento eficiente *in vitro* y su resistencia a la transducción retroviral. Los múltiples protocolos para tratamiento *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos con estímulo de citoquinas y la mejoría de la eficacia de los vectores retrovirales, con algunos resultados excelentes en ratones, han fracasado en humanos. Otra de las causas del fracaso de esta terapia es el escaso número de células diana disponible en médula ósea para llevar a cabo este tratamiento (9).

Las células de la Anemia de Fanconi son hipersensibles a agentes de entrecruzamiento del DNA como la MMC y el DEB que causan inestabilidad molecular y a la postre muerte celular. También son células con una muy deficiente capacidad de expansión al ser estimuladas con factores de crecimiento, con un aumento en el número de células apoptóticas y deficiencia en la diferenciación de las células.

Los primeros estudios sobre Terapia Génica en AF comenzaron a principios de los años 90. Walsh y colaboradores demostraron que un vector adenoasociado recombinante (rAAV) puede transferir una copia funcional del gen normal *Fancc* a linfoblastos y células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ corrigiendo el defecto fenotípico de estas células (10). Esta corrección se determinó por la resistencia de las células a la muerte inducida con la MMC y la menor susceptibilidad de rotura cromosómica en la línea celular linfoide. Las líneas celulares corregidas presentaban dos mutaciones conocidas distintas del gen *Fancc* que daban lugar a la misma enfermedad fenotípica. Utilizando análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el nivel de expresión del gen *Fancc* era equivalente al del gen endógeno. Los linfoblastos transducidos mantenían el fenotipo corregido en las células subsiguientes confirmando una integración proviral estable. También demostraron la transducción del rAAV de las células primarias hematopoyéticas tanto en estudios funcionales como moleculares. Los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ seleccionados y transducidos demostraron un incremento en la formación de colonias tanto en presencia como en ausencia de MMC. La primera publicación de transducción génica en células hematopoyéticas de ratón con un rAAV mostraba una eficacia de transducción de sólo el 1,5% porque estos vectores estaban contaminados con viriones salvajes tipo AAV que disminuían mucho la eficacia (11). Se ha conseguido generar vectores capaces de transferir genes al 60-70% de las células infectadas. La forma de cuantificar el gen *Fancc* transducido por rAAV en linfocitos humanos y células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ es utilizando PCR cualitativa puesto que sólo con la cuantificación del DNA en médula ósea se puede falsear el resultado al detectar también los genes en vectores no integrados. *In vitro* los intentos de cultivo de médula ósea muestran constantemente la reducción o ausencia de unidades formadoras de colonias de células hematopoyéticas. Estos pacientes también presentan alteraciones en el estroma de la médula ósea. Sin embargo los fibroblastos, células mayoritarias del estroma, de los pacientes con AF parecen expresar apropiadamente los factores de crecimiento hematopoyético demostrando que la AF es un defecto de una sola célula progenitora hematopoyética primitiva que presenta como característica su hipersensibilidad a la MMC, circunstancia que se aprovecha para demostrar que los linfoblastos AF-C transducidos con rAAV expresan el gen *Fancc* y muestran resistencia y crecimiento en presencia de MMC. Esto induce una auto-selección de células que expresan este gen ante concentraciones tan pequeñas de MMC como de 1nM, dosis que no afecta al crecimiento de CD34⁺ en individuos normales, reflejando el rescate genético de las células CD34⁺ tras la transducción con rAAV/*Fancc*. Por el contrario, la hematopoyesis es inhibida

cuando el gen *Fancc* es reprimido utilizando oligonucleótidos que lo inactivan (12) por lo que la conclusión es que el gen *Fancc*, además de intervenir en la fragilidad del DNA, influye en la eficacia de la hematopoyesis. La función biológica exacta del gen no se conoce. Hipótesis actuales sugieren que el defecto afecta a la reparación del DNA. Además de la susceptibilidad a la fragilidad del DNA estos pacientes presentan una reparación aberrante tanto espontánea como inducida químicamente dando lugar a aberraciones cromosómicas. También en este trabajo se demuestra que los linfoblastos transducidos con el gen *Fancc* son resistentes a la inestabilidad cromosómica. Las células de AF se encuentran claramente retrasadas durante la Fase G2 del ciclo celular. Los linfoblastos transducidos muestran una normalización de la cinética en este sentido.

En otro trabajo, Walsh y colaboradores demuestran la corrección funcional con éxito de cuatro líneas celulares de AF-C con cuatro mutaciones diferentes que incluyen errores de empalme y en codones de parada en el gen *Fancc*, utilizando vectores retrovirales que portan el gen normal *Fancc* (13,14). Estas mutaciones se han identificado aproximadamente en un 15% de los pacientes con AF. Estos resultados pueden tener implicaciones en el diagnóstico, fisiopatología y tratamiento del grupo C de AF. En primer lugar, los retrovirus pueden utilizarse para diagnosticar el grupo de complementación de la AF observando que las células CD34⁺ de un paciente, cultivadas con el retrovirus portador del gen *Fancc*, aumentaban la resistencia a la fragilidad inducida por la MMC. Al igual que ocurría en la línea celular linfoide, las células CD34⁺ enriquecidas eran extremadamente sensibles a la MMC. El vector *Fancc* es capaz de una reconstitución en células hematopoyéticas. Si se transduce en células progenitoras CD34⁺ aumenta la formación de colonias tanto en ausencia como en presencia de MMC a dosis superiores a 5nM, mientras que las células controles eran destruidas íntegramente a 1 nM. En este trabajo queda demostrado que los vectores retrovirales son capaces de transducir el gen normal *Fancc* a las células de la línea linfoide y a las células progenitoras hematopoyéticas y que la introducción del vector en células CD34⁺ aumenta marcadamente su crecimiento tanto en ausencia como en presencia de MMC. Estas células madre de AF así transducidas presentan una ventaja selectiva de crecimiento cuando son transplantadas *in vivo* a una médula ósea hipoplásica de AF.

En 1997, Liu y colaboradores publican el primer protocolo clínico diseñado para determinar si los progenitores hematopoyéticos transducidos con el gen *Fancc* normal pueden reinfundirse con garantías en pacientes con AF-C (14). Las células CD34 obtenidas de sangre periférica, tras movilización con G-CSF, se transducían *ex vivo* durante una semana con el vector retroviral *Fancc*. Estas células transducidas se reinfundían en los pacientes AF-C. Los pacientes deben ser monitorizados tanto para detectar problemas de toxicidad como para evidenciar el éxito de la transferencia génica y su expresión. El proceso se repetía un total de cuatro veces con cada tratamiento, cada 2-4 meses. Teóricamente estas células madre "rescatadas" deberían tener un crecimiento destacado en el ambiente hipoplásico de la médula ósea de la AF. El objetivo principal de este estudio fue investigar la seguridad de la técnica, determinar si es posible transferir el gen de la AF satisfactoriamente y determinar la extensión del injerto tras el trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas transducidas a pacientes afectados de AF sin previa mielo-ablación. El objetivo secundario fue investigar si la transferencia de un gen normal *Fancc* en pacientes portadores de alelos *Fancc* defectuosos, era capaz de revertir el fenotipo celular y mejorar la función hematopoyética.

En 1999 publican los resultados de la aplicación de este tratamiento en cuatro pacientes AF-C (15). Las mutaciones en el gen *Fancc* suponen un 10-15% de todos los casos y la transducción de un gen normal en células mutadas corrige la hipersensibilidad a la MMC y mejora su viabilidad *in vitro*. Cuatro pacientes AF-C (pac.1, pac.2, pac.3 y pac.4) que representaban los tres subgrupos de mutación de *Fancc* más importantes participaron en este ensayo clínico de transducción génica cuyo objetivo era la corrección del defecto hematopoyético. Tres de esos pacientes (pac.1, pac.2 y pac.3) recibieron tres o cuatro ciclos de transferencia génica, consistiendo cada uno de ellos en una o dos infusiones de células progenitoras hematopoyéticas autólogas que habían sido transducidas *ex vivo* con

un vector retroviral portador del gen normal *Fancc*. Antes de la infusión, el transgén *Fancc* fue detectado en células progenitoras CD34 enriquecidas. Tras la infusión también *Fancc* estaba presente transitoriamente en células de médula ósea y sangre periférica. La función del transgén normal *Fancc* se sugirió por un incremento importante en las colonias hematopoyéticas cuantificadas en cultivos *in vitro*, incluyendo el crecimiento de colonias en presencia de MMC, tras sucesivos ciclos de Terapia Génica en todos los pacientes. Se comprobó una mejoría transitoria en la celularidad de la médula ósea coincidiendo con la expansión de progenitores hematopoyéticos. El cuarto paciente (pac.4), recibió una única infusión de CD34⁺ enriquecidas y transducidas con el gen *Fancc*. Esta infusión fue seguida de radioterapia para una enfermedad maligna concurrente. Sólo tras la recuperación de la aplasia inducida por la radiación se detectaron transgenes *Fancc* sugiriendo que este tratamiento había actuado como un acondicionamiento eficaz para el injerto. En este ensayo, hasta la fecha, no se había observado una corrección en las células madre, sin embargo la infusión de las células progenitoras hematopoyéticas autólogas transducidas sí indujeron un importante incremento en la celularidad de la médula ósea y en el número de células progenitoras hematopoyéticas medidas por métodos clonogénicos. Estos resultados se observaron en los tres primeros pacientes independientemente de su variabilidad genotípica y fenotípica. Tras la transducción con *Fancc* aumentaba el número de progenitores inductores de formación de colonias por lo que se podía atribuir esta mejoría a la función del transgén y no únicamente a la infusión de progenitores cultivados y movilizados. Comparando las tasas de transferencia génica entre células mononucleares de médula ósea, células B, células T y granulocitos del paciente 1, el porcentaje de células positivas en médula ósea, menor del 0,1%, no era mayor que en sangre periférica. En los pacientes 1 y 4, se comprobó la transducción en células T y B. En el paciente 2, en el cual la transferencia génica se detectó de forma transitoria en células mononucleares de sangre periférica, parecía que la transducción tuvo lugar en células progenitoras de corta vida dando lugar a células mieloides pero no linfoides. El paciente 2 también tuvo escasa evidencia de corrección hematopoyética. La transferencia génica *Fancc* persistente debe de tener lugar en células progenitoras multipotenciales para obtener resultados clínicamente significativos. En el caso del 4º paciente sí parece que pudo transducirse una célula multipotencial de vida larga ya que la evidencia se ha obtenido al año de una única infusión. Sólo estudios posteriores confirmarán que la célula transducida fue una verdadera célula madre. También queda casi demostrado que el crecimiento selectivo y/o injerto de las células transducidas con *Fancc* puede haberse favorecido por un acondicionamiento tóxico para la producción de células sanguíneas.

Debido a que los protocolos basados en la estimulación *ex vivo* con citoquinas para la expansión de células madre hematopoyéticas no son aplicables por el momento en la Terapia Génica para la AF humana, Galimi y colaboradores investigan sobre la eficacia de los vectores derivados de lentivirus sobre progenitores completamente inactivos, no en fase de replicación celular, procedente de ratones con AF desnudos, *Fanca*^{-/-} y *Fancc*^{-/-} y en ausencia de tratamiento *ex vivo* con citoquinas (16). Para explorar el potencial de estos vectores fue diseñada una tercera generación de vectores lentivirales inactivos derivados de HIV, portadores de los genes *Fancc* y *Fanca*, y bajo el control del citomegalovirus. La actividad biológica de las proteínas codificadas por el lenti-*Fanca* y lenti-*Fancc* fue determinada por su capacidad para revertir el fenotipo de las células linfoides humanas de pacientes con AF. Estas células presentaban las características habituales de esta enfermedad con detención del crecimiento, anomalías cromosómicas y muerte celular al cultivarse con agentes de entrecruzamiento. Las líneas celulares transducidas con los apropiados lenti-AF mostraron una normalización del crecimiento respecto a la población control. Los vectores lentivirales también revirtieron las anomalías del ciclo celular en presencia de MMC. Investigando la capacidad de revertir las alteraciones genéticas de las células precursoras formadoras de colonias se obtuvieron células mononucleares de la médula ósea de los ratones y fueron transducidas con lenti-*Fanca* o lenti-*Fancc* y cultivadas con MMC comprobando la corrección genética que daba lugar a un aumento significativo de los precursores de formadores de colonias. Para demostrar esta corrección genética en las células precursoras hematopoyéticas procedieron a transplantarlas *in vivo* para comprobar

su injerto en estos ratones $Fanca^{-/-}$ y $Fancc^{-/-}$. Una semana después se administró una dosis única de ciclofosfamida (40mg/kg) para seleccionar *in vivo* las células corregidas. El número de células con la señal proviral fue aumentando progresivamente a lo largo de todo el experimento y fueron cuantificadas por PCR y "western blot" tras un primer y segundo trasplante. Ello demostró un injerto a largo plazo de los progenitores hematopoyéticos seleccionados con ciclofosfamida y transducidos con vectores lentivirales. La corrección hematológica de los ratones transplantados fue total con una simple exposición de las células mononucleares de la médula ósea, sin estimular, al vector lentiviral. Este estudio apoya la investigación de vectores lentivirales para la Terapia Génica humana de la AF.

Río y colaboradores de la *Red Nacional de Investigación de Anemia de Fanconi en España*, describen, en 2002, por vez primera, una corrección genética en ratones $Fanca^{-/-}$ después de la transducción con vectores retrovirales con el gen humano *Fanca* (17) (**Figura 3**). Teniendo en cuenta que la AF constituye la primera causa de fallo medular y dado que las mutaciones en el gen *Fanca* suponen el 60-70% de todas las AF, los modelos con ratones desnudos *Fanca* son una valiosa herramienta para la investigación de enfermedades hematopoyéticas de origen genético. Estos animales no reproducen la pancitopenia o la tendencia a desarrollar leucemias como en la AF humana pero sí la hipersensibilidad a agentes de entrecruzamiento de DNA (18), y en ocasiones sólo tras la exposición a dichos agentes puede ponerse de manifiesto la AF. Estos progenitores $Fanca^{-/-}$ muestran una alteración del crecimiento después del estímulo *in vitro* tanto del compartimiento de células madre hematopoyéticas como de células purificadas $Lin^{-}Sca^{+}$, células LS, que son las que se utilizan en este estudio. También en este trabajo se sugiere que el defecto es intrínseco a la célula hematopoyética y no al estroma de la médula ósea. Hasta este momento la evidencia de la alteración del crecimiento de progenitores de médula ósea se había descrito sólo en modelo de ratones *Fancc* tanto después del estímulo con factores de crecimiento como en ensayos de repoblación *in vivo* a largo plazo (19). Queda demostrado que el alcance del fenotipo de crecimiento de la médula ósea afecta a otros grupos de complementación y ofrece un modelo único capaz de reproducir este defecto del crecimiento en progenitores celulares de AF. A diferencia de lo que ocurre en células normales de médula ósea, la respuesta de la médula de $Fanca^{-/-}$ a la estimulación *in vitro* se caracteriza por una acelerada depleción de progenitores formadores de colonias granulomonocíticas, por una evidente alteración en la diferenciación de granulocitos y macrófagos y por una marcada susceptibilidad para entrar en apoptosis. Todo esto confirma lo observado hasta este momento en cuanto a la predisposición de las células de AF a la apoptosis. En lo referente a la Terapia Génica, en este trabajo de Río y colaboradores, se insiste particularmente en la creación de un diseño de ensayo clínico con especial cuidado en la estimulación farmacológica *in vivo* de las células madre hematopoyéticas. Aunque, generalmente, se utiliza el 5-fluoro-uracilo para promover la proliferación de células madre en ratones, en este experimento se obtuvieron primero de médula sin estimular, células madre hematopoyéticas y células purificadas $Lin^{-}Sca^{+}$ y fueron estimuladas muy discretamente con IL-11 y factor de células madre, demostrando que esta estimulación es compatible con el mantenimiento de la capacidad de repoblación de la médula ósea y la permanencia de la transducción. Una conclusión de estos estudios fue demostrar una transducción eficiente de células purificadas de ratones $Fanca^{-/-}$ comparable a los ratones salvajes $Fanca^{+/+}$. Una segunda observación fue comprobar la capacidad de los vectores retrovirales con el gen humano *Fanca* de revertir la sensibilidad a la MMC de las células de AF. Finalmente se confirma la normalización del crecimiento de las células $Fanca^{-/-}$ *in vitro* tras la transducción con el gen humano *Fanca*, así como la ventaja de estas células para proliferar en el individuo receptor del trasplante.

Este mismo grupo de investigación publica, en 2006, un trabajo donde se demuestra que la pre-estimulación de la médula ósea no es necesaria cuando se pretende corregir el fenotipo de células progenitoras de AF con vectores retrovirales (20) (**Figura 4**). Observaron que el porcentaje de células $CD34^{+}$ en médula ósea de los pacientes con AF era del 0,4%, equivalente al 25% de los valores observados en la población sana. El número medio de unidades formadoras de colonias era del 10% de los valores normales. Debido al bajo

número de células progenitoras los precursores deberían presentarse en un estadio proliferativo activo para ser transducidos por vectores gamma-retrovirales. Para minimizar la pérdida de las células madre durante el proceso de selección se utilizaron células mononucleares como células diana para vectores que portan el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP). Fueron transducidas después de un período de incubación muy corto con relación al utilizado en otros protocolos. Al cuantificar el número de progenitores y el porcentaje de colonias EGFP⁺, se observó que con una sencilla manipulación de la médula ósea *in vitro* de 24 horas se lograba transducir hasta el 43% de los progenitores de pacientes de AF-A. Posteriormente, se investigó la hipersensibilidad de los progenitores de AF-A a la MMC mejorando sustancialmente la supervivencia de los progenitores. Este protocolo parece más eficaz y seguro respecto a otros protocolos estándar de Terapia Génica.

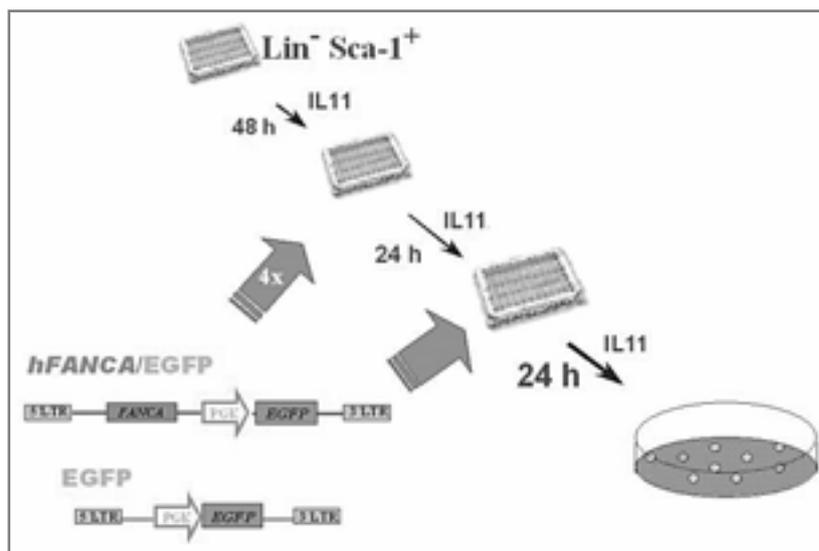


Figura 3. Corrección genética en ratones *Fanca*^{-/-} después de la transducción con vectores retrovirales con el gen humano *Fanca* (17).

En esta misma línea Cohen-Haguenaer y colaboradores demuestran que la supervivencia de las células de la médula ósea de pacientes con AF puede ser mejorada utilizando condiciones específicas de cultivo que limiten el estrés oxidativo (21). Por un lado, se centran en controlar la fragilidad celular y la muerte temprana y por otro en mejorar la transferencia génica teniendo en cuenta la biología de las células diana. Además, para minimizar la manipulación innecesaria que puede causar un daño celular adicional se utilizaron células de médula ósea completa. Por razones éticas relacionadas con la naturaleza específica de la enfermedad y la escasez de material celular de cada paciente, los experimentos se realizaron con un pequeño número de células. Se compararon diferentes condiciones de cultivos celulares en muestras procedentes de 9 pacientes afectados de AF-A. Se cultivaron en condiciones de hipoxia y fueron ensayadas en paralelo en presencia de tres agentes antioxidantes diferentes. Sólo se encontraron efectos positivos, estadísticamente significativos, en cuanto a la viabilidad celular y la supervivencia, en aquellas células cultivadas con N-acetilcisteína (NAC). Mayor aún fue el aumento de unidades formadoras de colonias. En estas condiciones de cultivo, las células de médula ósea se podían mantener más tiempo, el suficiente como para estudiar las condiciones óptimas para la transferencia génica. Se diseñó después un vector retroviral portador del gen *Fanca*. La primera demostración de la corrección génica fue en fibroblastos de AF que resistieron, a diferencia de los no transducidos, tanto a la exposición prolongada como a las altas dosis de MMC, no apareciendo las roturas cromosómicas típicas de estas células. Finalmente, pudo cuantificarse la cantidad de proteína *Fanca* en las células transducidas por medio de anticuerpos. Posteriormente, se demostró, en células primitivas de médula ósea, que en condiciones de hipoxia y en presencia de NAC las células transducidas con el retrovirus eran capaces de desarrollarse hasta un estroma medular normal puesto que al utilizar médula ósea completa las células del estroma y mesenquimales corregidas genéticamente proveían

de un soporte natural para el crecimiento de las células madre hematopoyéticas, y mantenían su desarrollo tras ser expuestas a condiciones normales de oxígeno.

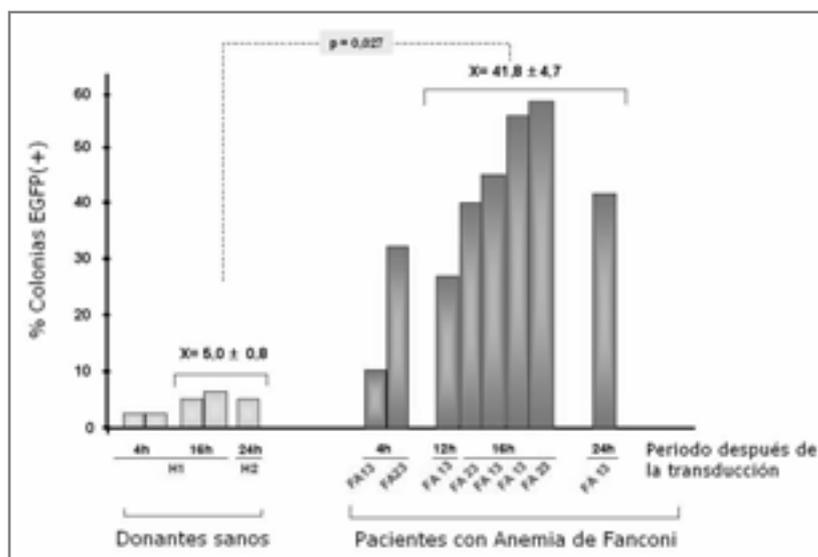


Figura 4. Corrección del fenotipo de células progenitoras de médula ósea de Anemia de Fanconi sin previa pre-estimulación *in vitro* (20).

Otro interesante descubrimiento fue la recuperación funcional tardía de la resistencia de la membrana celular y del diámetro celular. Hasta este momento, en estudios anteriores, se había sugerido un estado anormal de oxidación-reducción en estas células causantes de la fragilidad de membrana de las células de AF. Demostraron que la normalización de la fragilidad de membrana no se produce antes de los dos meses después de la transducción. La capacidad para soportar el estrés oxidativo se recupera de forma tardía, incluso cuando el DNA ya está replicándose. Otros experimentos en ratones desnudos *Fanca*^{-/-} y *Fancc*^{-/-} han demostrado una eficaz transferencia génica utilizando vectores y normalizando la hematopoyesis en estos ratones bajo condiciones habituales pero disminuyendo en condiciones de estrés (16).

Todos los experimentos realizados hasta ahora con células primitivas de pacientes con AF han presentado el problema de la limitación en el número de células para la investigación. Con este protocolo se demuestra que las células de médula de los pacientes *Fanca* pueden ser estimuladas para su crecimiento con escasa manipulación, en condiciones antioxidantes, con soporte de estroma autólogo y con régimen mínimo de citoquinas. Aún así, el reto clínico permanece porque se necesita un número suficiente de células primitivas del paciente para ser eficazmente transducidas y lograr una cierta capacidad potencial hematopoyética para reconstituir una médula ósea humana y mantener una adecuada producción, cuantitativa y cualitativa, de células sanguíneas periféricas. Hay una importante evidencia de que este potencial varía mucho de unos individuos a otros.

Pero la idea fundamental es que se debe perseguir ante todo la seguridad de la transferencia génica. Los futuros ensayos clínicos deberán utilizar los nuevos vectores que actualmente se están diseñando para lograr una mayor seguridad (22). Finalmente el éxito clínico en la AF queda supeditado a aquellos pacientes de reciente diagnóstico con escasa repercusión clínica, a partir de los cuales se puede obtener un buen acervo de células madre hematopoyéticas para intentar su corrección génica.

Referencias

1. Lobitz S, Velleuer E (2006) *Guido Fanconi* (1892-1979): A jack of all trades. *Nat Rev Cancer* 6: 893-8.
2. Mace G, Briot D, Guervilly JH, Rosselli F (2007) Fanconi Anemia: Cellular and molecular features. *Pathol Biol*, 55: 19-28.

3. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H (2002) Reverse mosaicism in Fanconi Anemia: Natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*, 98: 126-35.
4. Foe LT, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shaidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathew CG, Arwert F, Joenje H (1997) Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet*, 5: 137-48.
5. Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea A, Grompe M (2006) Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi Anemia. *Blood* 107: 3084-90.
6. Zhong L, Zhao W, Wu J, Maina N, Han Z, Srivastava A (2006) Adeno-associated virus-mediated gene transfer in hematopoietic stem/progenitor cells as a therapeutic tool. *Curr Gene Ther*, 6: 683-98.
7. Herzog RW, Cao O, Hagstrom JN, Wang L (2006) Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 509-22.
8. Williams DA, Croop J, Kelly P (2005) Gene therapy in the treatment of Fanconi Anemia, a progressive bone marrow failure syndrome. *Curr Opin Mol Ther*, 7: 461-6.
9. Croop JM (2003) Gene therapy for Fanconi Anemia. *Curr Hematol Rep*, 2: 335-40.
10. Walsh CE, Grompe M, Vanin E, Buchwald M, Young NS, Nienhuis AW, Liu JM (1994) A functionally active retrovirus vector for gene therapy in Fanconi Anemia group C. *Blood* 84: 453-9.
11. La Face D, Hermonat P, Peck A (1988) Gene transfer into hematopoietic progenitor cells mediated by an adeno-associated virus vector. *Virology* 162: 483-6.
12. Segal GM, Magenis RE, Brown M, Keeble W, Smith TD, Heinrich MC, Bagby GC (1994) Repression of Fanconi Anemia gene (FACC) expression inhibits growth of hematopoietic progenitor cells. *J Clin Invest*, 94: 846-52.
13. Walsh CE, Nienhuis AW, Samulski RJ, Brown MG, Miller JL, Young NS, Liu JM (1994) Phenotypic correction of Fanconi Anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J Clin Invest*, 94: 1440-8.
14. Liu JM, Young NS, Walsh CE, Cottler-Fox M, Carter C, Dunbar C, Barrett AJ, Emmons R (1997) Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi Anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther*, 8: 1715-30.
15. Liu JM, Kim S, Read EJ, Futaki M, Dokal I, Carter CS, Leitman SF, Pensiero M, Young NS, Walsh CE (1999) Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi Anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*, 10: 2337-46.
16. Galimi F, Noll M, Kenazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, Verma IM (2002) Gene therapy of Fanconi Anemia: Preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood* 100: 2732-6.
17. Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, Casado JA, Martinez J, Götsche K, Cheng NC, van de Vrugt HJ, Arwert F, Joenje H, Bueren JA (2002) *In vitro* phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi Anemia group A knockout mice. *Blood* 100: 2032-9.
18. Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, Oostra AB, Krimpenfort P, de Vries Y, Joenje H, Berns A, Arwert F (2000) Mice with a targeted disruption of the Fanconi Anemia homolog *Fanca*. *Hum Mol Genet*, 9: 1805-11.
19. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, Rathbun RK, Bagby GC (2000) The Fanconi Anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol*, 20: 4724-35.
20. Jacome A, Navarro S, Casado JA, Rio P, Madero L, Estella J, Sevilla J, Badell I, Ortega JJ, Olive T, Hanenberg H, Segovia JC, Bueren JA (2006) A simplified approach to improve the efficiency and safety of *ex vivo* hematopoietic gene therapy in Fanconi Anemia. *Hum Gene Ther*, 17: 245-50.
21. Cohen-Haguenaer O, Péault B, Bauche C, Daniel MT, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M (2006) *In vivo* repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi Anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 2340-5.
22. Leurs C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, Wissler M, Lindemann D, Von Kalle C, Rethwilm A, Williams DA, Hanenberg H (2003) Comparison of three retroviral vector systems for transduction of non obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34⁺ cord blood cells. *Hum Gene Ther*, 14: 509-19.

CAPÍTULO 10

Terapia Génica y hemofilia. Menor expresión en favor de una mayor seguridad

Antonio Liras

Las primeras descripciones de un defecto en la coagulación sanguínea son muy antiguas y así, ya Hipócrates (460 a.C.) señalaba como causa el enfriamiento de la sangre fuera del cuerpo y Maimónides (siglo v d.C.), en las famosas Leyes del Talmud Babilónico, aconsejaba no circuncidar a los tres primeros hijos en familias con antecedentes de sangrado. Pero, sin embargo los grandes avances en el conocimiento de la hemofilia y de su tratamiento se produjeron en la segunda mitad del siglo xx coincidiendo, en los años 50', con el nacimiento y desarrollo de las técnicas moleculares.

El siglo xviii fue fructífero en descripciones de este síndrome hemorrágico. Pero la primera descripción médica moderna en que se apuntaba el carácter ligado al sexo, corresponde a John Conrad Otto en 1803. El informe médico de Otto —aparecido en *The Medical Repository* de Nueva York— era evidente: “Familia con cuatro hijos varones que sangraban después de una herida trivial. Ninguna mujer de esta familia estaba afectada pero sí lo transmitían”. Esta descripción junto al hallazgo, unos pocos años antes por William Hunter, de que el plasma era el responsable de la coagulación y no los glóbulos rojos, y la descripción en 1890 por König de un signo clínico característico en el paciente hemofílico como es la afectación en rodillas, que hasta entonces se confundía con artritis o tuberculosis, abrieron una brecha importante en el camino de la historia de la hemofilia.

A finales del siglo xix esta enfermedad se conocía como “La Enfermedad Real” ya que afectó a las Casas Reales de Inglaterra, Prusia, España y Rusia (1). La patología hizo su aparición en un hijo y tres nietos de la Reina Victoria de Gran Bretaña (1819-1901). Después, el gen mutado se distribuyó entre las familias reales europeas durante el siglo xix y principios del xx influyendo en cierta manera, sobre todo en España y Rusia, en los eventos históricos. Era en esos años cuando el concepto sobre la etiología de la hemofilia se centraba en su carácter heredo-sifilítico, por lesiones celulares del endotelio, provocadas por una infección sifilítica en los progenitores. Fueron, Patek y Taylor los que, en 1937, (2) establecieron la razón causal de esta enfermedad: la deficiencia de la “globulina antihemofílica humana”, que establecía un antes y un después en la historia de esta enfermedad (**Tablas I y II**). Podemos afirmar que esta globulina era la primera “medicina” en potencia que introducida en un paciente hemofílico podía aliviar su dolencia.

La hemofilia, el avance tecnológico, y su tratamiento

Entre las enfermedades hereditarias descritas hasta ahora en la población humana —que ya son más de 4000— se encuentra la hemofilia causada por la deficiencia de los factores de la coagulación sanguínea VIII o IX que intervienen en la cascada de activación proteásica de la coagulación sanguínea (**Figura 1**) (3-5).

Son enfermedades ligadas al cromosoma X (Xq28 para Factor VIII y Xq27 para Factor IX), de rasgos recesivos con manifestaciones clínicas de riesgo hemorrágico y daño articular, y que se transmiten por las mujeres y son padecidas por los varones. Se da la situación de portadora obligada, es decir, toda hija de hemofílico y mujer sana que es capaz de transmitir la enfermedad sin padecerla. Esta deficiencia se debe a mutaciones —mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, inversiones y reorganizaciones— en los genes que codifican estas proteínas (6-8). En la **Figura 2** se muestra la transmisión hereditaria de la hemofilia con las posibilidades más probables de cruzamiento teniendo en cuenta que las mujeres hemofílicas son casos muy raros de supervivencia.

Tabla I
La distinta concepción en los conocimientos sobre la hemofilia antes y después de 1937

	Año 1922	Año 2007
Clasificación de la enfermedad	Hemodistrofia endocrina.	Coagulopatía congénita que cursa con deficiencia de Factor VIII (Hemofilia A) o de Factor IX (Hemofilia B).
Definición	Estado hemorrágico transmitido por la mujer y padecido por el varón, según las leyes de Granddier.	Enfermedad ligada al cromosoma X, recesiva, transmitida por las mujeres y padecida por los varones. Se da la situación de portadoras obligadas (las hijas de hemofílico y mujer sana).
Patogenia	Fragilidad del endotelio por deficiencia en la actividad tromboquinasa por lesión sifilítica del endotelio.	Mutaciones en los genes que codifican dos proteínas de la coagulación, los factores VIII y IX.
Mecanismo de acción	¿?	Los factores, que se sintetizan en el hígado, activan, por su acción proteásica, la cascada de la coagulación sanguínea para amplificar la señal de emergencia provocada por una herida.
Clínica	Pequeñas hemorragias que pueden conducir a la muerte. Se distingue la "gran hemofilia de los franceses" o grave, la hemofilia localizada como la renal y la hemofilia glosítica en mucosas. Artropatías en rodillas que no dejan secuelas.	Se dan tres grados de severidad según los niveles de factores en plasma: Grave (<1%), moderado (1-5%) y leve (5-30%). Se observan equimosis, hemorragias gingivales, hemartrosis, epistaxis, hemoptisis y hematurias. Secuelas invalidantes en las articulaciones mayores sin un tratamiento precoz.
Esperanza de vida	10 a 20 años.	70 a 75 años.
Tratamiento	Extracto de bromuro de clara de huevo. Harina de cacahuete. Veneno de serpiente. Transfusión de sangre de personas esplenectomizadas.	Infusión de factores exógenos, plasmáticos o recombinantes. Cirugía y rehabilitación fisioterapéutica. Futuros protocolos de Terapia Génica.

En 1952 dos grupos de investigación, uno el de Biggs y otro el de Aggeler (9,10), describieron y distinguieron los dos tipos principales de hemofilias (**Tabla III**), la de tipo A o clásica, y la de tipo B o enfermedad de Christmas, ambas ligadas al cromosoma X, de rasgos recesivos, con manifestaciones clínicas similares —riesgo hemorrágico y daños articulares— y que cursan con una deficiencia de los factores de la coagulación VIII y IX, respectivamente. Otras características diferenciales son el peso molecular de esas dos proteínas, el tamaño del DNA que las codifica, su vida media en el organismo o su concentración fisiológica normal en plasma.

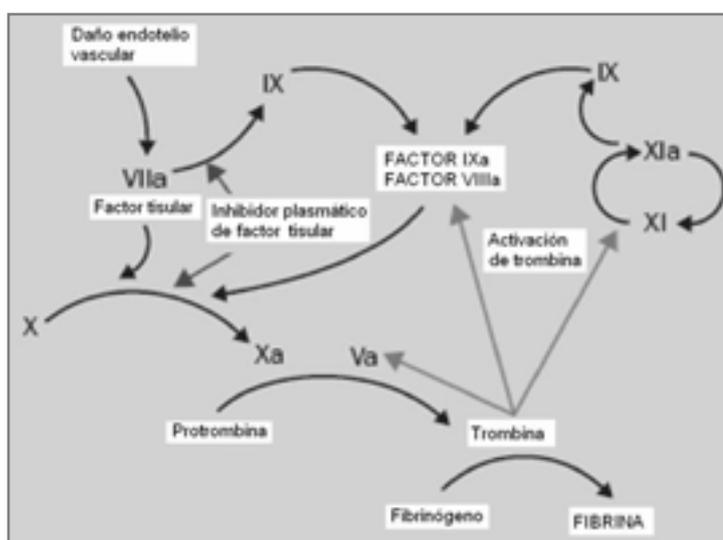


Figura 1. Cascada de la coagulación sanguínea en la que intervienen los factores de la coagulación VIII y IX deficitarios en la hemofilia A y B respectivamente (Adaptado Ref. 5).

Tabla II
Cronología de la hemofilia

Año	Acontecimiento
1937	Patek y Taylor demuestran que la deficiencia de la "globulina antihemofílica" humana es la causa de la hemofilia.
1944	Pavlovsky corrige <i>in vitro</i> la deficiencia de coagulación en un paciente hemofílico con plasma de otro hemofílico. Es el preludeo del descubrimiento de los dos tipos de hemofilia A y B.
1950	Mersk y Macfarlane establecen una prueba sensible y específica para detectar la globulina antihemofílica humana en plasma.
1952	Biggs y Aggeler diferencian las hemofilia A y B.
1955	Se establecen en Inglaterra las primeras recomendaciones para el tratamiento de la hemofilia mediante la utilización de plasma fresco humano.
1956	Macfarlane utiliza para el tratamiento globulina antihemofílica humana concentrada y obtenida de animales.
1960	Se utiliza, por primera vez, una mezcla de factores de la coagulación, Factor II, VII, IX y X para el tratamiento de la hemofilia B.
1962	Un Comité Internacional asigna números romanos a los factores de la coagulación: Factor VIII o globulina antihemofílica humana y Factor IX o factor de Christmas.
1963	Se crea la Federación Mundial de Hemofilia.
1965	Judith Pool prepara los primeros crioprecipitados de Factor VIII que se utilizarían hasta 1979 como tratamiento de elección para el paciente hemofílico.
1979	Tuddenham, Trabold, Collins y Hoyer purifican a homogeneidad el Factor VIII humano que se comienza a utilizar como tratamiento de pureza intermedia.
1984	Gitschier y col., clonan el gen que codifica el Factor VIII.
1985	Davie y col., clonan el gen que codifica el Factor IX.
1986	Se identifican las primeras mutaciones de los genes.
1987	Se empieza a utilizar Factor VIII de alta pureza inactivado contra agentes virales.
1988	Se comienza a utilizar Factor IX de alta pureza en el tratamiento de la hemofilia B.
1990	Se prepara y utiliza, como tratamiento, el Factor VIII recombinante, obtenido por técnicas de ingeniería genética, sin ser necesaria la utilización de plasma humano.
1994	Se obtiene y utiliza el Factor IX recombinante.
1995	Se diseñan en el laboratorio los ratones hemofílicos "knockout" delecionados para los genes de los factores de la coagulación.
2000	Se inician en hemofilia A y B, los primeros ensayos clínicos de Terapia Génica.

Tratamiento de la hemofilia: Reemplazamiento con factores exógenos

El tratamiento de la hemofilia se basa en el reemplazamiento o la suplementación con el factor de la coagulación que se encuentra deficitario en el paciente con el fin de prevenir o revertir un episodio de sangrado agudo. La forma más eficaz para llevar esto a cabo es la utilización de concentrados específicos del correspondiente factor deficitario (11-13).

Hasta los años sesenta, los hemofílicos eran tratados con sangre entera o plasma para compensar su deficiencia en los factores de la coagulación. La muy reducida concentración de factores en plasma obligaba a la administración de grandes volúmenes. Posteriormente, la puesta a punto de técnicas de extracción de los factores permitió obtener productos más purificados y más concentrados, con una reducción muy notable en las cantidades a inyectar y en la aportación de proteínas contaminantes, a veces mal toleradas. Con ello, se mejoró notablemente la calidad de vida de los pacientes. El aislamiento de proteínas plasmáticas, cuyo desarrollo se inició en 1982, se aplica actualmente a la producción comercial de distintos productos terapéuticos entre los que se encuentran los factores antihemofílicos VIII y IX, extraídos e inmunopurificados con anticuerpos monoclonales.

El gran acontecimiento que dio luz verde a una futura y definitiva terapia molecular de la hemofilia fue el aislamiento y clonaje de los genes que producen los factores de la coagulación. Así, el gen para Factor VIII humano se aisló en 1984 por el equipo de Gitschier de la Sociedad Genentech de San Francisco (14). Es uno de los mayores genes que se conocen y se extiende sobre una milésima del cromosoma X. De otra parte, el gen del Factor IX humano fue aislado y clonado en 1985 por el equipo de Davie y Kurachi de la

Universidad de Washington (15). Este gen, mucho más pequeño que el del Factor VIII, también está situado en la parte terminal del brazo largo del cromosoma X. Los factores de la coagulación se sintetizan, fundamentalmente, en hígado, pero también el riñón y el endotelio contribuyen aunque en un más bajo porcentaje.

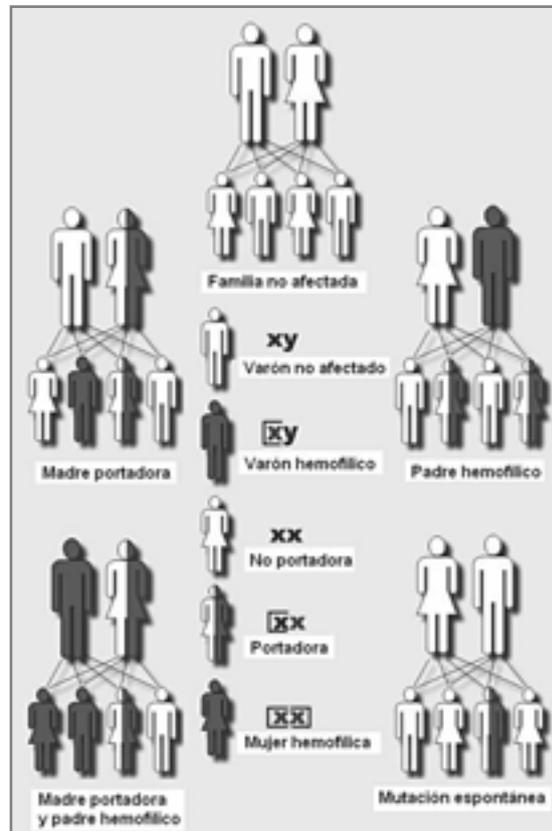


Figura 2. Transmisión hereditaria de la hemofilia.

Tabla III
Hemofilias de tipo A o clásica, y de tipo B o enfermedad de Christmas

Tipo	Frecuencia	Proteína (kDa), (bp)	Concentración en plasma (ng/ml)				Vida media (horas)
			Normal	Leve	Moderada	Severa	
A	1:6000	Factor VIII (280) (7056)	200	20	4	< 2	~10
B	1:30000	Factor IX (68) (1389)	5000	500	100	< 50	~20

Desde ese momento, surgió la posibilidad de preparar un factor, sin utilizar plasma humano —que tantas muertes de hemofílicos ha producido desde la década de los 80´ a raíz de la infección por el VIH y por el VHC—. Este fue el factor recombinante obtenido por tecnología recombinante en células de mamífero, de una alta eficacia y seguridad, pero de un alto costo que limita su utilización, todavía, en muchos países.

En la actualidad existe una gran variedad de factores VIII (FVIII) y IX (FIX) clásicos y modificados así como de factores recombinantes VIII (rFVIII) y IX (rFIX). Los concentrados de factores de la coagulación se clasifican según distintos criterios: i) La fuente o material inicial para su preparación que pueden ser mezclas de plasma o, por ingeniería genética, a partir de células de mamífero; ii) Su grado de pureza en base a la actividad específica en unidades internacionales (IU) o actividad coagulante por miligramo de proteína; iii) La inactivación de patógenos virales por distintos métodos; iv) Su mayor estabilidad durante el

proceso de preparación y, v) La presencia o ausencia de proteínas animales o humanas exógenas en el medio de cultivo como nutrientes de las células que producen el factor o bien como estabilizantes del producto final.

Así, se puede hablar, por tanto, de factores plasmáticos —los que se derivan de plasma humano— y de factores recombinantes —los que se derivan de células de mamífero por técnicas de ingeniería genética—. Dentro de estos últimos hablamos de factores de primera generación cuando contienen albúmina humana o animal tanto en el medio de cultivo celular como en el producto final; de segunda generación cuando solo utilizan albúmina en los medios de cultivo y de tercera generación cuando no presentan proteínas humanas ni animales ni en los medios de cultivo ni en el producto final como estabilizantes. En cuanto a que la molécula de factor esté truncada por haberse eliminado alguna región de la molécula que no es necesaria para su función, la eficacia es idéntica a la de los factores intactos. Tampoco se observan diferencias en la inducción de inhibidores por un tipo de molécula u otra.

La elección del producto terapéutico de reemplazamiento de entre todos los disponibles en España (**Tabla IV**) se determina, fundamentalmente, en base al criterio de la seguridad respecto a la transmisión de patógenos, ya sean virales o de otra naturaleza, y respecto al desarrollo de inhibidores. Por supuesto, en la elección del producto se barajan otros criterios quizás más secundarios como las condiciones clínicas analíticas del paciente, la disponibilidad del producto, la comodidad de preparación y administración, el coste e incluso el interés particular del médico que prescribe por una determinada marca o tipo de factor.

Lo que sí está claro y admitido de forma general, es que el uso de los concentrados plasmáticos disminuye en los países desarrollados mientras que se incrementa el de los factores recombinantes (12). Por supuesto, pero eso ha sucedido siempre en la historia médica del tratamiento de la hemofilia, los países en vías de desarrollo van a depender todavía mucho tiempo de los derivados del plasma aún a costa de los riesgos que eso conlleve.

Por otra parte, y para una mayor tranquilidad de los pacientes con hemofilia, a partir del presente año 2006 los productos para el tratamiento de la hemofilia se consideran como medicamentos esenciales en virtud del principio fundador de la Organización Mundial de la Salud (16) que establece que el acceso a medicamentos que preservan la vida es un derecho humano fundamental, hecho que es así en el caso de los factores antihemofílicos.

Esta claramente admitido a nivel internacional que hoy día todos los productos disponibles presentan la misma eficacia coagulante tanto para los tratamientos a demanda como para los profilácticos. También todos pueden provocar la aparición de inhibidores, variando mínimamente esa posibilidad de unos preparados a otros, en función del distinto método de preparación, las distintas modificaciones en la molécula o incluso por los distintos métodos de inactivación viral.

En cuanto a la seguridad frente a aquellos agentes patógenos que se transmiten por la sangre como es el caso del VIH (SIDA), VHC (hepatitis C), VHB (hepatitis B) y otros virus con cubierta lipídica, está, hoy día, prácticamente asegurada en todos los productos. Ahora bien, se deberá ser extremadamente cauto con los virus que no presentan cubierta lipídica como los parvovirus (PVB19) o el VHA (hepatitis A) y se deberá pensar en la posibilidad de que emerjan otros virus que ahora desconocemos. Pero respecto a la posibilidad de la transmisión por la sangre —ya demostrada en animales de experimentación (17)— de la variante en humanos del mal de las vacas locas o variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), ¿qué hacer?. Hoy por hoy, y hasta que se puedan detectar los agentes causales, o priones, en el plasma de los donantes, se deberá evitar la utilización de concentrados derivados del plasma y utilizar productos recombinantes y entre éstos los que contengan una menor cantidad de proteínas. La confianza en estos productos se avala por

la experiencia de más de 10 años de uso de factores recombinantes sin que se haya descrito todavía ningún efecto adverso, ni leve ni grave, hasta la fecha (18-20).

En cualquier caso, siempre la decisión de utilizar aquellos factores que no aseguren el no contagio con algún agente patógeno, dependerá de la “tolerancia al riesgo” tanto de los pacientes —siempre que sean bien informados— como del médico que prescriba.

Tabla IV
Inactivación viral y pureza de los distintos tipos de concentrados de factor

TIPO DE FACTOR	METODOS DE INACTIVACION Y PURIFICACION	PUREZA (UI/mg proteína)	CONTENIDO EN PROTEINAS CONTAMINANTES
Plasmático de pureza intermedia	<ul style="list-style-type: none"> • 60-80°C/10-72 horas • Solvente-detergente • Cromatografía de afinidad, nanofiltración 	Intermedia (10-100)	+++
Plasmático de alta pureza	<ul style="list-style-type: none"> • 60°C/10 horas • Solvente-detergente • Cromatografía por inmutofinidad 	Alta (> 3000)	++
Recombinante (1ª generación)	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía por inmutofinidad • Cromatografía de intercambio iónico • Albúmina en el medio de cultivo y en el producto final como estabilizante 	Alta (> 4000)	++
Recombinante (2ª generación)	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía por inmutofinidad • Cromatografía de intercambio iónico • Solvente-detergente • Ultrafiltración, nanofiltración • Albúmina en el medio de cultivo • SACAROSA EN EL PRODUCTO FINAL COMO ESTABILIZANTE 	Ultra alta (4000-15000)	+
Recombinante (3ª generación)	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía por inmutofinidad • Cromatografía de intercambio iónico • Solvente-detergente • Ultrafiltración, nanofiltración • NO PRESENTA ALBÚMINA EN EL MEDIO DE CULTIVO • TREALOSA EN EL PRODUCTO FINAL COMO ESTABILIZANTE 	Ultra alta (4000-10000)	-

En otro orden de cosas y en aquellos pacientes hemofílicos que han desarrollado inhibidores contra los factores VIII o IX (21), es de gran utilidad el Factor VII recombinante que actúa a través de la vía extrínseca de la coagulación. De la misma forma podríamos argumentar sobre la mayor seguridad de este producto respecto a los posibles agentes patógenos que se pueden encontrar en plasma, con relación a otros productos que se vienen utilizando para estos pacientes, como los concentrados de complejos de protrombina (PCCs) o de protrombina activada (APCCs-FEIBA).

En resumen, si estudiamos la pureza de los factores respecto a la proteína total que se inyecta el paciente en cada dosis, el coste por unidad y la seguridad relativa del producto, se concluye que tanto la pureza como la seguridad aumentan con los nuevos concentrados mientras que el coste relativo se mantendría, paradójicamente, si se estimaran los costes indirectos que se pueden derivar de la utilización de productos menos seguros (el coste de un tratamiento estándar con antirretrovirales está alrededor de los 20000 € por año y por paciente).

La biotecnología al servicio del tratamiento de la hemofilia

La biotecnología ofrece, en general, nuevas posibilidades para la mayoría de las enfermedades genéticas, tanto monogénicas como poligénicas. Estas nuevas y futuras posibilidades incluyen nuevas estrategias diagnósticas (22) pero, fundamentalmente,

terapéuticas más eficaces y seguras, tanto desde el punto de vista paliativo como curativo (23).

Factores exógenos modificados más eficaces

El futuro del tratamiento convencional de la hemofilia se presume muy esperanzador si consideramos los estudios más recientes sobre nuevas moléculas de factores coagulantes que siendo igual o más eficaces presentarán, sin embargo, ciertas peculiaridades como un mayor tiempo de presencia en sangre y menos efectos secundarios indeseables (24,25).

Así, se podrá disponer de factores recombinantes más económicos por aumentar la eficacia en la expresión en las células que lo producen. Por esta misma razón estarán más disponibles sin temer una falta de abastecimiento por una disminución en la producción. También, se podrá disponer de factores con una vida media en plasma mayor lo que supondrá que el número de inyecciones será menor al mantenerse más tiempo en plasma el factor exógeno perfundido; estarán disponibles factores con pequeñas modificaciones que eviten la aparición de inhibidores y, por supuesto, y derivado de todo esto, los protocolos de profilaxis podrán ser una práctica más extendida por ser más seguros (26). Por último, el tratamiento de la hemofilia se basará, fundamentalmente, en la utilización global de productos recombinantes de tercera o cuarta generación, totalmente seguros respecto a la transmisión de agentes infectivos de cualquier tipo, al carecer todos ellos de proteínas y componentes de origen animal o humano.

Nuevas estrategias para el tratamiento de pacientes con inhibidor

En este sentido se están ensayando, todavía en fases preclínicas, dos estrategias que se presentan muy esperanzadoras. De una parte, la utilización de mezclas de pequeños fragmentos de proteínas sintetizados en el laboratorio y que presentan una estructura y secuencia similar a aquellas regiones de los factores que producen una respuesta inmunológica de rechazo al reconocerlas el organismo como extrañas. De esta forma, estos péptidos "engañarían, despistarían" a los anticuerpos uniéndose a ellos y dejando libre al factor que se acaba de inyectar. La idea, pues, sería la neutralización de los inhibidores (27).

La segunda estrategia, quizás más avanzada en el tiempo, es sintetizar factores modificados precisamente en esas secuencias que producen la respuesta de rechazo. Técnicamente es más sencillo y no sería necesario administrar conjuntamente con el factor ninguna otra molécula o fármaco. En este sentido se está desarrollando un factor modificado químicamente con orto-fosfo-L-serina en aquellas regiones que producen la respuesta inmunológica que da lugar a los anticuerpos inhibidores (28).

Terapia Génica

La Terapia Génica que se basa en transferir al paciente el gen que se encuentra defectuoso para producir por sí mismo el factor coagulante VIII o IX sin necesidad de inyectarlo, será en el futuro el tratamiento definitivo de la hemofilia. Pero mientras eso llega no se deben transmitir falsas esperanzas respecto a este tipo de terapia porque las dificultades son muchas y algunas difíciles de solucionar (29-32).

Terapia Génica de la hemofilia. Un reto, una esperanza

El tratamiento de la hemofilia, en nuestro siglo xxi, se centrará inevitablemente en la aplicación y optimización de las nuevas tecnologías de Biología Molecular, de Ingeniería Genética y de Biología Celular, que se traducirá en la utilización de determinados protocolos personalizados e individualizados de Terapia Génica o Terapia Celular (33,34).

La primera cuestión que nos debemos plantear es si se justifica la Terapia Génica para la hemofilia vistos los tratamientos tan eficaces y tan seguros que en la actualidad ya están disponibles. La respuesta es claramente afirmativa por un gran número de razones. La primera de ellas es que los actuales tratamientos son tan solo paliativos y no eliminan la causa de la enfermedad mientras que la Terapia Génica, aunque todavía muy a largo plazo, puede representar la forma de curar, en el más estricto sentido de la palabra, la hemofilia. Pero hay más razones que lo justifican como el carácter crónico de la patología, un tratamiento muy periódico e incomodo por vía intravenosa especialmente en los tratamientos profilácticos en niños y adultos en que se precisan hasta tres perfusiones por semana; por otra parte, el tratamiento exógeno con factores ha conllevado riesgos fatales por la infección por el VIH y el VHC y puede seguir siéndolo por otros agentes infecciosos emergentes como los priones y conllevar, como de hecho así ya es, una alteración muy significativa del estado inmunológico del paciente; por último los tratamientos actuales recombinantes que son los más eficaces y seguros son también los más costosos y por esto inalcanzables para la mayor parte de los pacientes hemofílicos.

Vistas las razones que justifican la investigación de futuros protocolos de Terapia Génica para el tratamiento y curación de la hemofilia, la segunda cuestión es si es factible. En primer lugar, hay que considerar que la hemofilia es una enfermedad monogénica hecho que facilita los abordajes experimentales. En segundo lugar, y no menos importante, es el hecho de que una pequeña expresión de la proteína deficitaria (factor) —por encima del 5% del nivel normal— conseguiría un fenotipo moderado de la enfermedad. En tercer lugar, existen ciertas ventajas desde el punto de vista experimental, como el disponer de un amplio abanico de tipos celulares diana; no precisarse regulación de la expresión génica de estas proteínas; disponer de un alto grado de conocimiento de las características moleculares y funcionales de los factores VIII y IX y la disposición de muy buenos modelos animales hemofílicos para los estudios —camada de Auburn (Hemofilia A), camada de Chappel Hill (Hemofilia B), ratones hemofílicos "*knockout*"—.

En función de todos estos argumentos, y sin llegar al optimismo de Mannucci y Tuddenham (35) que les llevo a afirmar en 2001 que la Terapia Génica para la hemofilia sería una realidad en la primera década de nuestro siglo, hay opiniones encontradas al respecto sobre la realidad futura a largo plazo de este tipo de terapia. Expertos en el tratamiento de la hemofilia, como Negrier (36), están convencidos de ello, pero otros por el contrario, como el Profesor Giangrande (37) de la Federación Mundial de Hemofilia, no lo tienen tan claro.

Como ya se ha comentado en varios capítulos de este mismo libro las futuras terapias moleculares se basarán en la conjugación de la Terapia Génica y la Terapia Celular (34). En este sentido el escenario para la hemofilia es, de una parte, la transferencia génica mediante vectores virales, básicamente virus adenoasociados y lentivirales; de otra parte Terapia Génica basada en la utilización, fundamentalmente, de células madre de tejidos adultos y fibroblastos autólogos; también se comienza a considerar con mayores expectativas la transferencia génica no viral —liberación hidrodinámica, liberación de nanopartículas, transferrinfección, electroporación—, y también la reparación del DNA mediante oligonucleótidos quiméricos o con nucleasas quelantes de zinc, la utilización de los RNAs interferentes o más recientemente mediante el "*spliceosome-trans-splicing*" en que un RNA mensajero se modifica para dar dos especies diferentes e independientes de RNAs (38).

La aplicación de todas estas técnicas no es inocua y hay que solucionar un gran número de obstáculos que impiden el éxito tan esperado desde ya hace bastantes años desde que se comenzaron los primeros experimentos de Terapia Génica. Así, habrá que solucionar o atenuar en el peor de los casos, el grave problema de los vectores retrovirales cual es la mutagénesis insercional o el no menos importante de la respuesta inmunológica tanto innata como adquirida frente a ciertos vectores virales que pueden producir efectos adversos graves anafilácticos o en el mejor de los casos una reducción en la eficacia de

transducción génica o la eliminación de las células transducidas que se introducen como vectores de un gen.

La situación general actual de las estrategias de Terapia Génica aplicadas a la hemofilia se fundamenta tanto en protocolos *ex vivo* como *in vivo*. Mientras estos dos tipos de protocolos se muestran igualmente eficaces salvo en determinadas ocasiones concretas, como ya se ha comentado en el capítulo 1 de este libro, la utilización de los vectores ha evolucionado de distinta forma a lo largo de los años desde el inicio de su utilización allá por el año 1985. Esta evolución de “caída” para unos y de “apogeo” para otros se basa sencillamente en los riesgos que conllevan cada uno de ellos y por ende en la relación riesgo-beneficio para cada una de sus aplicaciones específicas en los distintos tipos de patologías. Los vectores retrovirales se comenzaron a utilizar desde 1985 en la mayoría de las investigaciones de Terapia Génica algo que no es de extrañar ya que en esos momentos era con estos virus con los que se había acumulado una mayor experiencia y un mayor conocimiento (**Figura 3**). Esta situación, que en la experimentación básica era idílica, no era la más apropiada en el caso de querer transferir genes en un ser vivo. Fue la mutagénesis insercional, como grave efecto secundario, la que condicionó su desuso a lo largo del tiempo, al menos, para su aplicación en Terapia Génica. Hubo que ensayar otras posibilidades y así en la experimentación sobre Terapia Génica de la hemofilia surgieron otros vectores —más seguros en paralelo a la caída en el uso de los vectores retrovirales— como los adenovirales, los adenoasociados y más paulatinamente los lentivirales basados en el VIH. Ya en nuestro siglo xxi el futuro parece estar, al menos en nuestro actual estado de conocimientos y experiencia, en los vectores adenoasociados, en los lentivirales y aunque de forma mucho más pausada en los vectores o transferencia génica no viral, que más adelante se comentará en este capítulo.

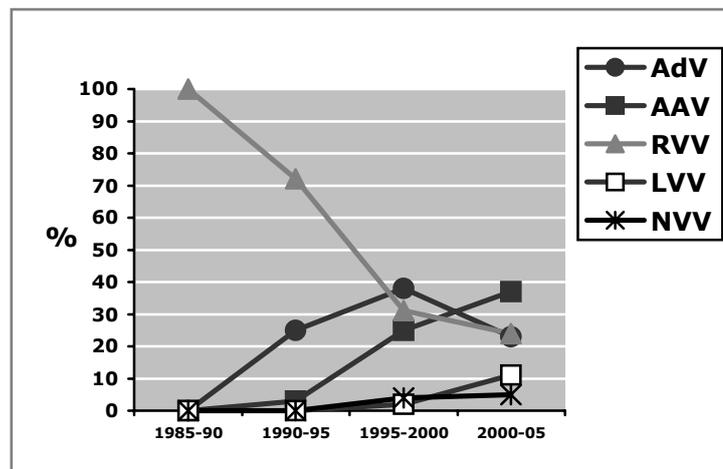


Figura 3. Utilización de los distintos vectores de transferencia génica en su aplicación en el tratamiento de la hemofilia. AdV, vectores adenovirales; AAV, vectores adenoasociados; RVV, vectores retrovirales; LVV, vectores lentivirales; NVV, vectores no virales.

En los últimos años, se han producido —después de un periodo de estancamiento— importantes avances en los protocolos de Terapia Génica aplicados a modelos animales hemofílicos (39). En rasgos generales se pueden destacar algunos de ellos como la expresión de Factor VIII en ratones hemofílicos utilizando células sanguíneas o plaquetas después de la transferencia génica *ex vivo* de células madre hematopoyéticas, o mediante la transferencia *in vivo* de transposones que expresan Factor VIII en células endoteliales y hepatocitos (40). Por su parte, en modelos hemofílicos de animales superiores se ha ensayado con éxito la transferencia neonatal en perros del gen de Factor VIII mediante vectores retrovirales. También la utilización de vectores adenoasociados de doble cadena ha ofrecido una expresión de Factor IX 28 veces superior a la obtenida con los de cadena sencilla. En humanos las cosas no han ido todavía muy bien ya que el mejor resultado ha

sido una expresión de Factor IX de un 10% respecto al valor normal mediante la administración directa en hígado de un vector adenoasociado de cadena sencilla. La expresión de la proteína se obtuvo tan solo durante 1 mes debido a la respuesta inmunológica contra las células transfectadas.

La tendencia actual en hemofilia, como ya se ha comentado anteriormente, es la utilización de vectores adenoasociados (AAV) y lentivirales (LVV) con los que más recientemente se están logrando los mejores resultados (**Tabla V**). Respecto a los vectores adenoasociados el serotipo AAV8 se presenta como el más esperanzador respecto al tropismo celular, la eficacia de transducción y la antigenicidad (41,42). La combinación de distintos serotipos de virus adenoasociados, uno para transferir el gen y otro para desensibilizar frente a la respuesta inmune, puede ser una buena alternativa para evitar el inconveniente de la disminución de eficacia en la expresión (43).

Tabla V
Resultados preclínicos más relevantes y más recientes en Terapia Génica de la hemofilia utilizando vectores virales

Grupo de investigación	Vector	Vía de administración	Modelo	Expresión	Efectos adversos
<i>Hauck et al.</i> (Ref. 44)	AAV1/AAV2	Muscular	Murino	FIX 10% 1 año	Respuesta inmune
<i>Jiang et al.</i> (Ref. 45)	AAV2/AAV6/ AAV8	Hepática	Murino/ Canino	FVIII 100% 3 años	Respuesta inmune
<i>Sarkar et al.</i> (Ref. 46)	AAV8/AAV9	Hepática	Murino/ Canino	FVIII 100% 1 año	Respuesta inmune
<i>Schuettrumpf et al.</i> (Ref. 47)	AAV2	Hepática	Humano	FIX 1-10% >12 semanas	Diseminación del vector en semen. Respuesta inmune
<i>Nathwani et al.</i> (Ref. 48)	AAV de doble cadena (dsAAV)	Hepática	Murino	FIX 3-30% 1-6 meses	—
<i>Nathwani et al.</i> (Ref. 49)	AAV8	Infusión venosa periférica	Macaco	FIX 22% >9 meses	—
<i>Ohmori et al.</i> (Ref. 50)	LVV	Infusión venosa periférica de plaquetas transfectadas <i>ex vivo</i>	Murino	FVIII <5% 90 días	—
<i>Bigger et al.</i> (Ref. 51)	LVV	Infusión venosa periférica de células madre hematopoyéticas transfectadas <i>ex vivo</i>	Murino	FIX 10% 1 año	—
<i>Chen et al.</i> (Ref. 52)	LVV	Infusión venosa periférica de células madre hematopoyéticas transfectadas <i>ex vivo</i>	Murino	FIX 1% 7 días	—
<i>Sun et al.</i> (Ref. 53)	LVV	Transfección de células 293T <i>in vitro</i>	—	FVIII Expresión de la proteína durante 20 semanas	—
<i>Matsui et al.</i> (Ref. 54)	LVV	Transfección <i>ex vivo</i> de células madre endoteliales e implante subcutáneo	Murino/ Canino	FVIII 1% 20 semanas	Desaparición del implante
<i>Xu et al.</i> (Ref. 55)	RVV	Intravenosa	Neonatos Murino/ Canino	FVIII 22% (ratón), 5% (perro) 1,5 años	—

El futuro: ¿Células madre adultas..., embrionarias? ¿Vectores adenoasociados, lentivirales..., no virales?

Las posibilidades de predecir el futuro en cuanto a cuál será el mejor tipo de células o el vector más apropiado, dependen en gran medida de ser capaces de responder a tres cuestiones fundamentales: ¿Será fácil la extrapolación a organismos superiores, como el hombre, de los resultados en cuanto a la seguridad y a los niveles de expresión obtenidos en pequeños modelos animales? ¿Será la combinación Terapia Génica/Terapia Celular y la utilización de las células madre mesenquimatosas las herramientas terapéuticas del futuro?. ¿Habrá que decantarse por los vectores NO VIRALES?

Está claro que las células madre o embrionarias derivadas de determinados tejidos como la piel o adiposo junto con las hematopoyéticas se presentan como candidatas muy adecuadas por su facilidad de obtención y reimplantación y por sus características peculiares de diferenciarse y, por tanto, de mantener más tiempo la transgénesis. Más en concreto, las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes que presentan una amplia aplicación potencial en la terapéutica fundamentalmente, hoy por hoy, en determinados desordenes vasculares, neurológicos o el cáncer (56-59).

En este orden de cosas son especialmente relevantes los trabajos de Fair y de Doering. El grupo de Fair (60) ha conseguido la corrección de la deficiencia de Factor IX en ratones hemofílicos "*knockout*" para hemofilia B mediante un protocolo que es típicamente de Terapia Celular, hasta ahora el único relacionado con el tratamiento de la hemofilia. Este elegante experimento demuestra como utilizando células madre embrionarias de ratón (ES), diferenciadas *in vitro* mediante el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), durante 7 días, hasta precursores endodérmicos (PEPs), e inyectadas en hígado producen una expresión del 10% de Factor IX durante 2 meses. Los resultados de Doering y colaboradores (61), pese a ser menos llamativos, abren una nueva puerta para la aplicación de protocolos de Terapia Génica en pacientes hemofílicos con inhibidores. En este caso las células madre hematopoyéticas son las protagonistas.

Continuando en la predicción del futuro, las esperanzas se centran cada vez más en la utilización de los vectores no virales, de una parte por los inconvenientes, en ocasiones fatales, que presentan los vectores virales y de otra, por los grandes avances (62,63) que se vienen produciendo en la puesta a punto de nuevos vectores no virales cada vez más eficaces para transferir un gen como ya se ha explicado en el capítulo 3 de este mismo libro.

Ocupan lugar destacado los métodos de transferrinfección utilizando ligandos que presentan un receptor de internalización en la membrana celular (64); la electroporación, fundamentalmente, con vectores episomales como el virus de Epstein-Barr en que se han obtenido expresiones de hasta un 5% de Factor VIII durante 90 días en células COS-7 (65) o más recientemente, por el grupo de Tros de Ilarduya, la utilización de microesferas para la liberación de DNA plasmídicos (66).

Estas nuevas posibilidades metodológicas de los vectores no virales y la óptima manipulación de células madre o embrionarias nos permitirán llegar más lejos y con menores riesgos. Así, es posible la utilización de métodos no virales para la transferencia de genes combinados con algunas de las técnicas más sofisticadas, que también se han comentado en este libro, como es la aplicación de los RNAs de interferencia. En este sentido Hoelters y colaboradores han desarrollado un método altamente eficaz de Terapia Génica utilizando vectores no virales, RNAs de interferencia y células madre mesenquimales humanas (67).

Llegados a este punto podríamos incluso imaginar el poder actuar a nivel de otros orgánulos celulares para la transferencia de un gen. Pues bien, no es necesario imaginar porque el grupo de Liu (68) ha conseguido diseñar un vector no viral dirigido al DNA ribosomal

humano ("human ribosomal DNA-targeting vector"). Este vector —denominado *pHrneo*— dirige genes heterólogos al DNA ribosomal humano (hrDNA) con una eficacia de integración por encima de 10^{-4} - 10^{-5} . Utilizando este vector Liu y colaboradores, mediante transducción *ex vivo* de hepatocitos por electroporación, han logrado una expresión de Factor VIII de $4,3 \pm 0,9$ ng por millón de células y durante 24 horas.

En la misma línea que siguen las más recientes tendencias en los protocolos de Terapia Génica en general, es decir, la utilización por una parte de vectores no virales que conllevan una mayor seguridad terapéutica para el paciente y de otra parte la utilización de células madre fáciles de obtener y perpetuar aprovechando su capacidad de diferenciación para incrementar la eficacia y el tiempo de expresión génica, el grupo de Liras y colaboradores (69), están llevando a cabo la optimización de protocolos de Terapia Génica *ex vivo* para la hemofilia B mediante la utilización de vectores no virales —transferrinfección— y células madre mesenquimatosas de tejido adiposo adulto (**Figura 4**).

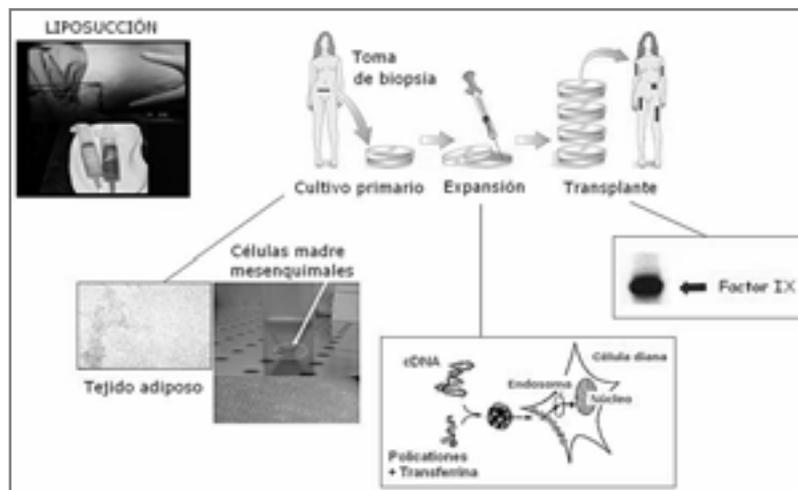


Figura 4. Protocolo experimental de Terapia Génica *ex vivo* mediante transferrinfección en células madre mesenquimales de tejido adiposo adulto (Ref. 69).

Aplicabilidad clínica de la Terapia Génica en hemofilia: Ensayos clínicos

En los últimos dos años, se han venido desarrollando varios ensayos clínicos de Fase I tanto para hemofilia A como para hemofilia B (70). Los protocolos que se ha utilizado se han basado, fundamentalmente, en Terapia Génica *in vivo* utilizando vectores virales para la liberación directa de los genes, pero también en protocolos *ex vivo* mediante transfección con plásmidos y reimplantación de células transfectadas. Aunque en todos los casos la transferencia de los genes era evidente e incluso se observó en algunos casos efectos terapéuticos, no fue posible el mantenimiento de la expresión, tanto de Factor VIII como de Factor IX, en niveles terapéuticos a medio y largo plazo.

En este escenario desalentador, las esperanzas en el momento actual se centran en la utilización de vectores adenoasociados que se han mostrado, hoy por hoy, como los más seguros y eficaces dentro de los vectores virales. Aún así, se debe intentar solucionar el gran inconveniente de la disminución y desaparición de la expresión de los transgenes por la respuesta inmunogénica, hecho que ha representado la causa fundamental del fracaso de los ensayos clínicos desarrollados hasta ahora. En este sentido, se inicia en la actualidad un nuevo ensayo clínico de Terapia Génica para la hemofilia B (Fase I), cuyo título oficial es: "A Phase 1 safety study in subjects with severe hemophilia B (Factor IX deficiency) using adeno-associated viral vector to deliver the gene for human Factor IX into the liver coupled with transient immunomodulation" (71).

Este ensayo, que se encuentra en el periodo de reclutamiento de los pacientes, se llevará a cabo en el Hospital Infantil de Filadelfia —promotor del ensayo— con la colaboración de la Universidad Estatal de Campinas de Estados Unidos. El objetivo de este estudio es determinar la seguridad y eficacia de un vector viral adenoasociado —en régimen de inmunomodulación—, que porta el gen del Factor IX humano, mediante inyección directa en hígado por cateterismo en la arteria hepática derecha.

Sobre el diseño del estudio se puede decir que será un ensayo clínico intervencional y no observacional, es decir, que se producirá una intervención médica específica sobre los sujetos participantes para evaluar sus efectos. Además se trata de un ensayo clínico abierto —todas las partes implicadas en el estudio conocen el tratamiento que recibe cada paciente—; será un estudio de comparación de dosis, de un único grupo de tratamiento y diseñado para evaluar tanto la eficacia como la seguridad del tratamiento. El número total de sujetos que tomarán parte en el estudio es de nueve y el estudio constará de 3 ramas (subgrupos) de tratamiento. Cada una de estas ramas coincidirá con una cohorte de sujetos a los que se les administrarán dosis crecientes de los vectores AAV. Los sujetos de cada cohorte recibirán la construcción *AAV2-hFIX16* mediante infusión tras ser incluidos en el estudio y se les hará un seguimiento durante al menos 6 semanas. La decisión sobre el paso de un sujeto a una cohorte de mayor dosis estará basada en las evaluaciones intermedias sobre la seguridad. Los datos recogidos de todos los sujetos de una determinada cohorte hasta al menos 4 semanas posteriores a la infusión del vector, serán analizados por el Comité de Seguimiento de la Seguridad de Fármacos (Drug Safety Monitoring Board) antes del paso a una dosis superior. Dicho paso no se producirá hasta que, al menos, un sujeto de la cohorte anterior haya completado su tratamiento inmunosupresor sin toxicidad condicionada por la dosis.

La novedad que incorpora este ensayo y que puede condicionar el éxito, la encontramos en los trabajos de Mingozzi y colaboradores (72) en que logran atenuar la respuesta citotóxica inmune que se produce contra la cápsida del vector, en este caso del virus adenoasociado, que tiene como resultado el aclaramiento y apoptosis de los hepatocitos transducidos. La estrategia consiste en llevar a cabo un régimen anti-células T, diseñado para bloquear esa respuesta inmune, previo a la inyección del vector de transferencia. Este régimen se basa en la administración de tres fármacos, el mofetil micofenolato (MMF), sirolimús y daclizumab (anticuerpo contra el receptor de la IL-2), que se relaciona con la generación de inhibidores contra el Factor IX. El resultado final es una disminución dramática de células T reguladoras del tipo $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ que son las responsables, en último término, de la respuesta citotóxica inmune.

La decisión final consensuada médico-paciente: ¿Menor tiempo de expresión pero mayor seguridad para el paciente?

Aunque hablar de una decisión consensuada entre el médico y el paciente para adoptar una determinada acción clínica puede parecer trivial, en esta ocasión —aunque debería ser siempre así en la práctica clínica ordinaria— toma especial relevancia. Las dos razones que dan consistencia a esta idea —siempre en base a criterios bioéticos (73)— son de una parte las derivadas de la propia metodología a seguir, como es un protocolo de Terapia Génica, que como se ha venido confirmando a lo largo de este libro conlleva, hoy por hoy y en un futuro próximo también, riesgos a veces difíciles de asumir y de controlar. Esto que es una razón general para la aplicación de la Terapia Génica para cualquier patología en aras de una alta relación beneficio-riesgo, se particulariza con otra razón de peso en el caso de la hemofilia. Esta razón se deriva de la historia médica de los tratamientos de esta patología y en concreto con los efectos iatrogénicos fatales debidos a la infección del VIH y del VHC que han hecho al paciente hemofílico y a algunos médicos hematólogos ser extremadamente cautos con los actuales y futuros tratamientos. Esto quiere decir que aunque la Terapia Génica se presenta como una muy buena alternativa para la curación de la hemofilia es posible que sea más difícil que en otras patologías que la población hemofílica se preste al

ensayo de nuevos protocolos innovadores relacionados con esta técnica y más especialmente con la utilización de vectores virales.

En la mayoría de los casos, como ya se ha señalado, la aplicación de la Terapia Génica tendrá que ser específica para cada patología en concreto e individualizada y personalizada para cada paciente. Es más llamativo este concepto en el caso de la hemofilia porque como se ha apuntado más arriba la historia de su tratamiento no es una cuestión baladí. Pensemos en la realidad actual de estos pacientes: Las infecciones por el VIH y el VHC han mermado en un 50% la población de los pacientes con hemofilia; muchos de los pacientes que han sobrevivido presentan graves alteraciones inmunológicas y clínicas de su estado general de salud; muchos (el 60%) están condenados a una cirrosis o carcinoma hepático debido al VHC que no es sensible a los actuales tratamientos. Ante esta realidad desalentadora es fácil imaginar el estado de sensibilización de médicos y pacientes que hace pensar en que la posibilidad de utilizar vectores virales de forma voluntaria por los pacientes se pueda casi descartar.

En otras palabras, es posible imaginar dos situaciones: Una la del médico ante el paciente que le explica la posibilidad de una Terapia Génica con virus, en que el enfermo se abruma, y otra en la que médico explica al paciente la posibilidad de los vectores no virales inocuos y sin riesgos aunque con un menor tiempo y nivel de expresión. ¿Cuál será de las dos la más exitosa para iniciar un ensayo clínico?

Esta idea, que se concluye a partir de determinadas estadísticas dentro de la población hemofílica, es posible que cambie si se dan otras alternativas más seguras, como son los vectores no virales. Porque, además, la hemofilia como entidad clínica con sus características peculiares que ya se han comentado, no se presenta muy exigente para este tipo de estrategia terapéutica. Por una parte es suficiente un 5% de expresión de la proteína defectuosa para lograr un fenotipo moderado que nada tiene que ver con uno grave, ya que la calidad de vida se incrementa muy significativamente. Pero hay otra cuestión que puede animar a médicos y pacientes para la aplicación de la Terapia Génica en hemofilia y es que una expresión de unos meses ya representa un gran éxito para un paciente que se ha de inyectar factor exógeno, dos o tres veces por semana, por vía intravenosa.

Es decir la apuesta en hemofilia está y es de suponer que así será en el futuro, en una Terapia Génica *ex vivo* sobre células fácilmente extraíbles de forma mínimamente invasiva e incruenta (tejido adiposo o piel), fácilmente transfectables por métodos no virales, y cómodamente reimplantables, que por su capacidad de perpetuar la transgénesis —las células madre y embrionarias son las más adecuadas—, se logren niveles terapéuticos y periodos de expresión moderados. En otras palabras, un menor tiempo y nivel de expresión a cambio de una mayor seguridad. Vistas estas exigencias, el futuro de la Terapia Génica para la hemofilia se torna más esperanzador y factible.

Aún así, se tendrá que salvar esa barrera inter-especie que hace no asegurar, en modelos superiores como el humano —por lo visto hasta ahora—, la reproducibilidad de los resultados obtenidos en pequeños modelos animales.

En fin, se puede afirmar que las investigaciones en Terapia Génica para la hemofilia se ven alentadas por los propios médicos y pacientes que viven con la esperanza, aunque sea para las generaciones venideras, de conseguir una mayor calidad vida y una mayor comodidad del tratamiento que afianzara la integración plena —que en buena parte ya se ha conseguido— del paciente hemofílico tanto desde el punto de vista socio-laboral como personal.

¡En eso se está!

Referencias

1. Rubio A, Lucía JF (2000) Hemofilia: Historia de la Realeza. Ed. Real Fundación "Victoria Eugenia". Madrid.
2. Patek AJ, Taylor FHL (1937) Hemophilia. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J Clin Invest*, 16: 113-24.
3. Liras A (2002) Hemofilia: Pasado, presente y futuro (Parte I). *Médico General*, 6: 7-10. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.grupomundomedico.com>.
4. Liras A (2002) Hemofilia: Pasado, presente y futuro (Parte II). *Médico General*, 7: 7-9. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.grupomundomedico.com>.
5. Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ (2003) Haemophilias A and B. *Lancet* 361: 1801-9.
6. Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL (2004) Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 10(Supl 4): 133-9.
7. Mitchell M, Keeney S, Goodeve A. UK Haemophilia Centre Doctors' Organization Haemophilia Genetics Laboratory Network (2005) The molecular analysis of haemophilia B: A guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 11: 398-404.
8. Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. UK Haemophilia Centre Doctors' Organization Haemophilia Genetics Laboratory Network (2005) The molecular analysis of haemophilia A: A guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 11: 387-97.
9. Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey H (1952) Christmas disease: A condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J*, 2: 1378-82.
10. Aggeler PM, White SG, Glendening MB, Page EW, Leake TB, Bates G (1952) Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency; a new disease resembling hemophilia. *Proc Soc Exp Biol Med*, 79: 692-4.
11. Batlle FJ, Villar A, Liras A, Altisent C, Brito D, Alonso C, Moreno M, Lucía F, Sedano C, Prieto M, Calvente N, Aznar JA, Jiménez V, Soriano V (2006) Recomendaciones para la selección y uso de productos terapéuticos para el tratamiento de la hemofilia y otras coagulopatías congénitas. Ed. Real Fundación "Victoria Eugenia". Madrid. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.hemofilia.com/fotos/964dtmy8f7w.pdf>.
12. Josephson CD, Abshire TC (2006) Clinical uses of plasma and plasma fractions: Plasma-derived products for hemophilias A and B, and for von Willebrand disease. *Best Pract Res Clin Haematol*, 19: 35-49.
13. Liras A (2006) Lineas generales de actuación en el tratamiento de la hemofilia. Actualización 2006. *Rev Fed Hemof*, 37: 40-50. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.hemofilia.com/fotos/usp08me9wl0.pdf>.
14. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312: 326-30.
15. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K (1985) Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 24: 3736-50.
16. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2006) La OMS confirma a los productos para el tratamiento de la hemofilia como "Medicamentos Esenciales". [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.wfh.org/3/4/4_1_Link1_EssentialMedicines_SP.htm.
17. Farrugia A, Ironside JW, Giangrande P (2005) Variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by plasma products: Assessing and communicating risk in an era of scientific uncertainty. *Vox Sang*, 89: 186-92.
18. Liras A (2005) Más de 20 años de "medicinas recombinantes". Tratamiento actual de elección para evitar las enfermedades emergentes (Parte I). *Rev Fed Hemof*, 35: 46-50. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.hemofilia.com/fotos/2os3onuwyrn.pdf>.
19. Liras A (2005) Más de 20 años de "medicinas recombinantes". Tratamiento actual de elección para evitar las enfermedades emergentes (Parte II). *Rev Fed Hemof*, 36: 48-52. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.hemofilia.com/fotos/g5tc12zkd.pdf>.
20. Liras A (2005) Terapia recombinante. ¿Del escepticismo a la aplicación de elección? *Rev Act Farmacol Terp*, 3: 165-7. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.socesfar.com/pdf/aft3.pdf>.
21. Wight J, Paisley S (2003) The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: A systematic review. *Haemophilia* 9: 418-35.
22. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, Coppola A, Di Minno G, Salvatore F (2007) Haemophilia A: Molecular insights. *Clin Chem Lab Med*, 45: 450-61.
23. Dargaud Y, Negrier C (2007) Haemophilia therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 7: 651-63.
24. Kessler CM (2005) New Perspectives in Hemophilia Treatment. *Hematology* 429-35. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/reprint/2005/1/429>.
25. Key NS, Negrier C (2007) Coagulation factor concentrates: Past, present, and future. *Lancet* 370: 439-48.
26. Saenko EL, Pipe SW (2006) Strategies towards a longer acting factor VIII. *Haemophilia* 12(Supl 3): 42-51.
27. Kopecky EM, Greinstetter S, Pabinger I, Buchacher A, Romisch J, Jungbauer A (2005) Combinatorial peptides directed to inhibitory antibodies against human blood clotting factor VIII. *Thromb Haemost*, 94: 933-4.
28. Purohit VS, Ramani K, Sarkar R, Kazazian HH, Balasubramanian SV (2005) Lower inhibitor development in hemophilia A mice following administration of recombinant factor VIII-O-phospho-L-serine complex. *J Biol Chem*, 280: 17593-600. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/280/18/17593.pdf>.
29. Liras A (2001) Gene therapy for haemophilia: The end of a "royal pathology" in the third millennium? *Haemophilia* 7: 441-5.
30. Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EGD (2004) Prospects for gene therapy of haemophilia. *Haemophilia* 10: 309-18.
31. High K (2005) Gene transfer for hemophilia: Can therapeutic efficacy in large animals be safely translated to patients? *J Thromb Haemost*, 3: 1682-91.
32. Herzog RW, Cao O, Hagstrom JN, Wang L (2006) Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 509-22.

33. Chuah MKL, Collen D, Vandendriessche T (2004) Preclinical and clinical gene therapy for haemophilia. *Haemophilia* 10(Supl 4): 119-25.
34. Lillicrap D, Vandendriessche T, High K (2006) Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia* 12(Supl 3): 36-41.
35. Mannucci PM, Tuddenham EG (2001) The hemophilias: From royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*, 344: 1773-9.
36. Negrier C (2004) Gene therapy for hemophilia? *J Thromb Haemost*, 2: 1234-5.
37. Giangrande PL (2004) Gene therapy for hemophilia? *J Thromb Haemost*, 2: 1236-7.
38. Chao H, Walsh CE (2006) RNA repair for haemophilia A. *Expert Rev Mol Med*, 8: 1-8.
39. Ponder KP (2006) Gene therapy for hemophilia. *Curr Opin Hematol*, 13: 301-7.
40. Liu L, Mah C, Fletcher BS (2006) Sustained FVIII expression and phenotypic correction of hemophilia A in neonatal mice using an endothelial-targeted sleeping beauty transposon. *Mol Ther*, 13: 1006-15.
41. Mizukami H, Ozawa K (2006) Utility of AAV vectors derived from novel serotypes. *Yakugaku Zasshi* 126: 1021-8.
42. Nam HJ, Lane MD, Padron E, Gurda B, McKenna R, Kohlbrenner E, Aslanidi G, Byrne B, Muzyczka N, Zolotukhin S, Agbandje-McKenna M (2007) Structure of Adeno-Associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J Virol*, 81: 12260-71.
43. Hoffman BE, Dobrzynski E, Wang L, Hirao L, Mingozzi F, Cao O, Herzog RW (2007) Muscle as a target for supplementary factor IX gene transfer. *Hum Gene Ther*, 18: 603-13.
44. Hauck B, Xu RR, Xie J, Wu W, Ding Q, Sipler M, Wang H, Chen L, Wright JF, Xiao W (2006) Efficient AAV1-AAV2 hybrid vector for gene therapy of hemophilia. *Hum Gene Ther*, 17: 46-54.
45. Jiang H, Lillicrap D, Patarroyo-White S, Liu T, Qian X, Scallan CD, Powell S, Keller T, McMurray M, Labelle A, Nagy D, Vargas JA, Zhou S, Couto LB, Pierce GF (2006) Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* 108: 107-15.
46. Sarkar R, Mucci M, Addya S, Tetreault R, Bellinger DA, Nichols TC, Kazazian HH (2006) Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. *Hum Gene Ther*, 17: 427-39.
47. Schuettrumpf J, Liu JH, Couto LB, Addya K, Leonard DG, Zhen Z, Sommer J, Arruda VR (2006) Inadvertent Germline Transmission of AAV2 Vector: Findings in a Rabbit Model Correlate with Those in a Human Clinical Trial. *Mol Ther*, 13: 1064-73.
48. Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Waddington SN, Tuddenham EG, Kembal-Cook G, McIntosh J, Boon-Spijker M, Mertens K, Davidoff AM (2006) Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107: 2653-61. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16322469>.
49. Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Cochrane M, Gray E, Tuddenham EG, Davidoff AM (2007) Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood*, 109: 1414-21.
50. Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y (2006) Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ib-alpha promoter: In vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J*, 20: 1522-4.
51. Bigger BW, Siapati EK, Mistry A, Waddington SN, Nivsarkar MS, Jacobs L, Perrett R, Holder MV, Ridler C, Kembal-Cook G, Ali RR, Forbes SJ, Coutelle C, Wright N, Alison M, Thrasher AJ, Bonnet D, Themis M (2006) Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene Ther*, 13: 117-26.
52. Chen H, Yao H, Huang L, Shen Q, Jia W, Xue J (2006) Expression of human factor IX gene in murine plasma through lentiviral vector-infected haematopoietic stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33: 1196-201.
53. Sun HY, Cheng H, Li ZY, DU B, Zeng LY, Lu QX, He XP, Pan XY, Xu KL (2007) Expression of Recombinated Canine Factor VIII *In Vitro* Mediated by Lentiviral Vector. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 15: 845-8.
54. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, Hebbel RP, Galipeau J, Hough C, Lillicrap D (2007) Ex Vivo Gene Therapy for Hemophilia A That Enhances Safe Delivery and Sustained In Vivo FVIII Expression From Lentivirally-engineered Endothelial Progenitors. *Stem Cells* 25: 2660-9.
55. Xu L, Nichols TC, Sarkar R, McCorquodale S, Bellinger DA, Ponder KP (2005) Absence of a desmopressin response after therapeutic expression of factor VIII in hemophilia A dogs with liver-directed neonatal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 6080-5.
56. Picinich SC, Mishra PJ, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D (2007) The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell- & tissue-based therapy. Expert Opin Biol Ther* 7: 965-73.
57. Schuleri KH, Boyle AJ, Hare JM (2007) Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 180: 195-218.
58. Tamaki Y (2007) Novel approach for management of age-related macular degeneration antiangiogenic therapy and retinal regenerative therapy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 111: 232-68.
59. Hall B, Andreeff M, Marini F (2007) The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*, 180: 263-83.
60. Fair JH, Cairns BA, Lapaglia MA, Caballero M, Pleasant WA, Hatada S, Kim HS, Gui T, Pevny L, Meyer AA, Stafford DW, Smithies O, Frelinger JA (2005) Correction of factor IX deficiency in mice by embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 2958-63. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15699326>.
61. Doering CB, Gangadharan B, Dukart HZ, Spencer HT (2007) Hematopoietic stem cells encoding porcine factor VIII induce pro-coagulant activity in hemophilia A mice with pre-existing factor VIII immunity. *Mol Ther*, 15: 1093-9.

62. Ratanamart J, Shaw JA (2006) Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy for circulating therapeutic protein replacement: A tale of the tortoise and the hare? *Curr Gene Ther*, 6: 93-110.
63. Tan PH, Chan CL, George AJ (2006) Strategies to improve non-viral vectors: Potential applications in clinical transplantation. *Expert Opin Biol Ther*, 6: 619-30.
64. Tros de Ilarduya C, Arango MA, Düzgüneş N (2003) Transferrin-lipoplexes with protamine-condensed DNA for serum-resistant gene delivery. *Methods Enzymol*, 373: 342-56.
65. Mei WH, Qian GX, Zhang XQ, Zhang P, Lu J (2006) Sustained expression of Epstein-Barr virus episomal vector mediated factor VIII *in vivo* following muscle electroporation. *Haemophilia* 12: 271-9.
66. Díez S, Tros de Ilarduya C (2006) Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 63: 188-97.
67. Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gülkan H, Böcker W, Schieker M, Jochum M, Neth P (2005) Non-viral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 7: 718-28.
68. Liu X, Liu M, Xue Z, Pan Q, Wu L, Long Z, Xia K, Liang D, Xia J (2007) Non-viral *ex vivo* transduction of human hepatocyte cells to express factor VIII using a human ribosomal DNA-targeting vector. *J Thromb Haemost*, 5: 347-51.
69. Liras A, Villar A, García-Olmo D, García M, Tros de Ilarduya C (Real Fundación "Victoria Eugenia") (2007) Terapia Génica *ex vivo* en hemofilia B mediante vectores no virales en células madre mesenquimatosas de tejido adiposo adulto. *Baxter BioScience Spain* (ConfíHe-2007). [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.seth.es/docs/confihe/iniciativas_premiadas_2006.pps.
70. Pierce GF, Lillicrap D, Pipe SW, Vandendriessche T (2007) Gene therapy, bioengineered clotting factors and novel technologies for hemophilia treatment. *J Thromb Haemost*, 5: 901-6.
71. A Phase 1 Safety Study in Subjects With Severe Hemophilia B (Factor IX Deficiency) Using Adeno-Associated Viral Vector to Deliver the Gene for Human Factor IX Into the Liver Coupled With Transient Immunomodulation. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00515710?order=1>.
72. Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, Edmonson SA, Hui DJ, Sabatino DE, Zhou S, Wright JF, Jiang H, Pierce GF, Arruda VR, High KA (2007) Modulation of tolerance to the transgene product in a non-human primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 110: 2334-41.
73. DiMichele D, Chuansumrit A, London AJ, Thompson AR, Cooper CG, Killian RM, Ross LF, Lillicrap D, Kimmelman J (2006) Ethical issues in haemophilia. *Haemophilia* 12(Supl 3): 30-5.

CAPÍTULO 11

La infección por el VIH/SIDA. Inhibición de la replicación viral mediante RNAs de interferencia

Miguel Ángel Martínez

A principios de la década de 1980 apareció una nueva enfermedad infecciosa que ha cambiado la actitud mundial hacia el sexo y la sangre. Esta enfermedad, denominada Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), está causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por una progresiva destrucción del sistema inmunológico. Las rutas fundamentales de la transmisión del VIH son el contacto sexual y la sangre.

Desde la primera descripción de pacientes infectados por el VIH, en 1981 (1), 65 millones de personas han sido infectadas por el virus, y se estima que esta cifra pueda llegar a los 100 millones al final de la presente década. Aunque unos pocos pacientes infectados han permanecido asintomáticos durante cerca de 20 años hasta la fecha no se ha descrito ninguna curación de la infección. Se estima que más de 20 millones de infectados han fallecido durante los últimos 20 años.

En las últimas dos décadas, el conocimiento sobre el VIH y el SIDA ha aumentado de forma exponencial, y lo que es más importante, se ha logrado conocer cómo detener el curso fatal de la enfermedad y también cómo desarrollar tratamientos eficaces como son los fármacos antirretrovirales. Sin embargo, todavía no ha sido posible curar la enfermedad ni encontrar una vacuna eficaz que la prevenga.

La infección por el VIH se caracteriza (**Figura 1**) por un prolongado período asintomático que puede ir desde unos pocos años hasta décadas; este período asintomático va seguido de la fatal aparición del SIDA. Su principal característica es la aparición de una serie de infecciones oportunistas que incluyen otros virus, bacterias e incluso hongos. La menor o mayor rapidez en la progresión hacia el SIDA está directamente relacionada con la velocidad con la que desciende el número de linfocitos CD4⁺, que son las células diana del VIH. La velocidad con la que decrece el número de células CD4⁺ viene determinada por la concentración del virus que se detecta en el plasma (carga viral), de aquí que la cuantificación tanto del número de linfocitos CD4⁺ como de virus en plasma sean los valores que rutinariamente se emplean en el seguimiento clínico de los pacientes infectados.

El tratamiento antirretroviral

La introducción del tratamiento antirretroviral, diseñado para inhibir la replicación del VIH, ha transformado, en aquellos países con acceso a estas terapias, el impacto clínico del SIDA. En los últimos diez años se ha desarrollado una serie de fármacos muy potentes dirigidos a inhibir la replicación del VIH.

Las estrategias antivirales contra el VIH de tipo 1 (VIH-1) se han centrado fundamentalmente en la inhibición de la proteasa viral y de la enzima encargada de la replicación del RNA viral, la retrotranscriptasa (RT). La RT es la enzima que cataliza la síntesis del DNA proviral a partir del RNA. Así la ddi (didanosina), la ddC (zalcitabina), la 3TC (lamivudina), la d4T (estavudina), el abacavir y el tenofovir, todos análogos de

nucleósido, inhiben la RT; por otro lado, la nevirapina, la delavirdina y el efavirenz, inhibidores no análogos de nucleósido, también lo hacen.

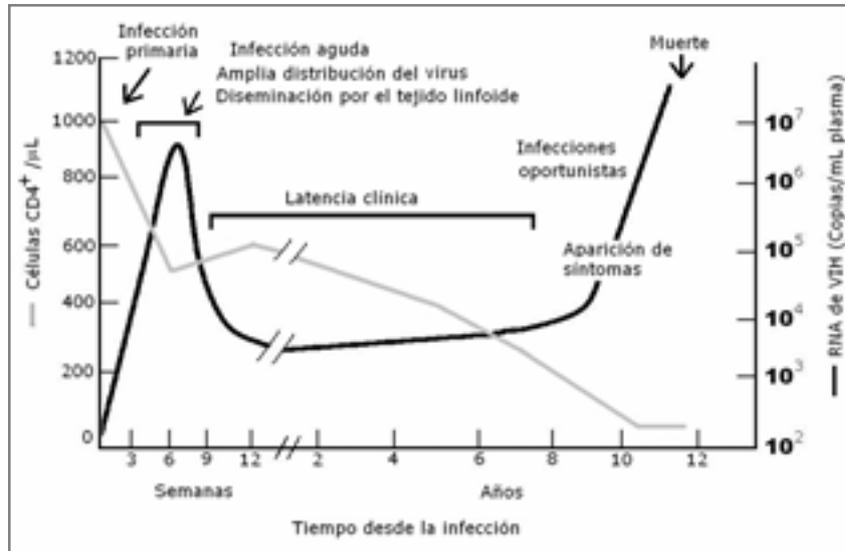


Figura 1. Historia natural de la infección por el VIH-1.

La segunda enzima del VIH-1 que se ha intentado inactivar con inhibidores, es la proteasa viral. Esta enzima cataliza la fragmentación de las poliproteínas precursoras virales *gag* y *gag-pol* en las proteínas definitivas que formarán parte de los viriones. Por lo que respecta a la proteasa viral, existen seis compuestos aprobados para la práctica clínica: Indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. Desde el año 2003, también se dispone de fármacos dirigidos contra la glucoproteína de la envoltura como es el péptido T-20 dirigido contra la subunidad transmembrana de la glucoproteína de la envoltura viral. En la actualidad se encuentran en fase muy avanzada de experimentación nuevos inhibidores de la unión del virus a la célula, así como inhibidores de la integrasa viral, que también es esencial para la supervivencia del virus.

Ahora bien, es importante señalar que únicamente entre un 5% y un 10% de los pacientes infectados en todo el mundo tiene acceso a los diferentes fármacos antirretrovirales. Desafortunadamente, debido a la alta tasa de replicación viral (2) y a la baja fidelidad de copia de la RT (3), el VIH-1 desarrolla rápidamente resistencias frente a todos los inhibidores descritos (**Figura 2**).

Desde hace cerca de una década, la introducción de tratamientos que incluían la combinación de tres o más antivirales dirigidos contra la RT y la proteasa del VIH-1, ha permitido reducir significativamente la carga viral (copias del RNA viral por mL de plasma), hasta hacerla indetectable en pacientes infectados con el virus (4). Coincidiendo con la introducción de estas terapias antirretrovirales combinadas a finales de 1996, la incidencia del SIDA disminuyó progresivamente en aquellos países con acceso a los diferentes tratamientos antirretrovirales.

Sin embargo, estos tratamientos combinados no son eficaces en todos los pacientes tratados. Las razones de este fracaso parcial en el control de la enfermedad son, por una parte, la utilización de tratamientos subóptimos incapaces de lograr la supresión de la replicación viral y la posterior aparición de virus resistentes a los fármacos, y por otra, el solapamiento de las mutaciones de resistencia entre los fármacos pertenecientes a una

misma familia de inhibidores (análogos de nucleósido, no análogos de nucleósido o inhibidores de la proteasa) (5). Otra razón del fracaso terapéutico es la toxicidad de estas combinaciones de fármacos. Por último, incluso en aquellos pacientes que reciben tratamiento combinado y que presentan una total supresión de viremia plasmática es posible detectar un reservorio del virus en los linfocitos CD4⁺ (6) y persistencia de replicación viral (7). Estos resultados han puesto de manifiesto la imposibilidad de erradicar el VIH mediante la utilización de los actuales tratamientos antirretrovirales de combinación.

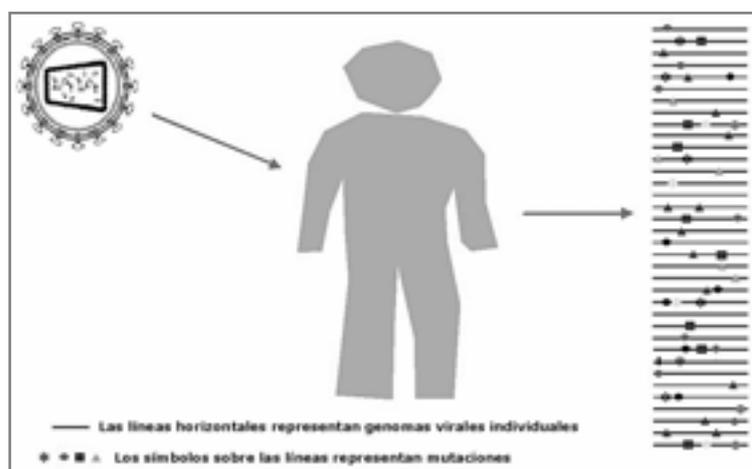


Figura 2. La alta tasa de replicación del VIH-1 y la baja fidelidad de copia de la RT condicionan la muy alta capacidad de desarrollo de resistencias del virus frente a los fármacos antirretrovirales cuando se utilizan de forma aislada.

Inhibición de la replicación viral mediante RNAs interferentes

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) mediado por RNAs interferentes (RNAi) de doble cadena está emergiendo como una herramienta muy poderosa para la inhibición específica de la expresión de genes. En células de mamífero, duplex de RNA de 21 nucleótidos de longitud, conocidos como siRNAs (*"short-interfering RNAs"*), inhiben eficientemente la expresión génica. Recientes investigaciones (8), han demostrado que los siRNAs dirigidos tanto contra genes virales como celulares son capaces de inhibir específicamente la replicación del VIH. Estos resultados abren nuevas posibilidades de intervención terapéutica tanto frente al VIH, como frente a otros virus RNA (**Figura 3**).

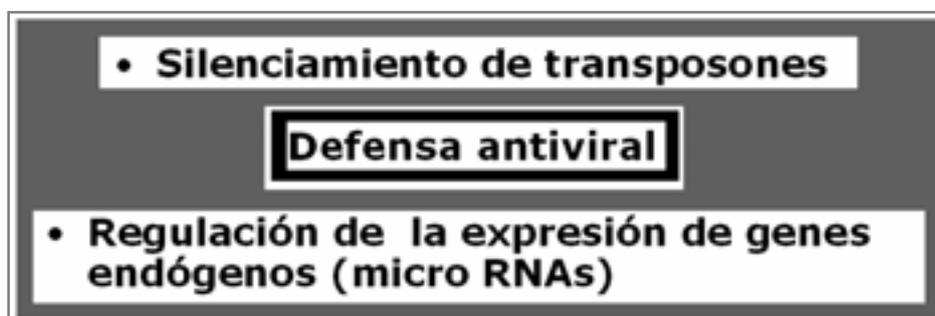


Figura 3. Funciones biológicas del RNA de interferencia (RNAi).

Como se ha mencionado anteriormente, las opciones terapéuticas para combatir la infección por el VIH continúan expandiéndose con el desarrollo de nuevas drogas y de nuevas estrategias para su uso. No obstante, el manejo de pacientes infectados con el VIH ha llegado a ser muy complejo. La emergencia de resistencias a las diferentes drogas actualmente utilizadas en el tratamiento de pacientes infectados, así como su toxicidad a largo plazo justifica el esfuerzo continuado en el desarrollo de nuevas estrategias antivirales.

La interferencia génica mediada por RNA es como el sistema inmune intracelular

Los vertebrados han desarrollado un sistema inmune para defenderse de los intrusos. Dos características principales predominan en el sistema inmune, la especificidad frente a los foráneos y la capacidad para amplificar la respuesta de defensa. El fenómeno de la interferencia mediada por RNA (RNAi), también denominado silenciamiento del RNA, se asemeja al sistema inmune en que su función natural es la de proteger al genoma contra la invasión de elementos genéticos en movimiento tales como los transposones y los virus. La interferencia mediada por RNA es normalmente descrita como un silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), en el cual RNAs de doble cadena (dsRNA) desencadenan la degradación citoplasmática de RNAs mensajeros (mRNA) homólogos. A pesar de que este sistema fue originalmente descrito en plantas superiores (9) y posteriormente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (10), también ha sido observado en insectos, hongos y vertebrados. La interferencia mediada por RNA no se ha encontrado en *Archea* y procariotes por lo que es probable que se trate de una innovación eucariota.

La relevancia del RNAi como un mecanismo de defensa celular frente a posibles intrusos fue demostrada mediante el descubrimiento de que los virus de plantas codifican proteínas que inhabilitan el PTGS mediante la inhibición de la degradación del dsRNA (9). Estos experimentos fueron posteriormente confirmados para un virus que infecta células de insecto (11). De igual manera, los virus que infectan a vertebrados, como es el caso del VIH, han desarrollado mecanismos que inhiben el silenciamiento génico mediado por RNA (12). No obstante, el mecanismo del RNAi no va solo dirigido a la degradación específica de dsRNAs sino que también puede actuar frente a moléculas de RNA de cadena única idénticas en secuencia a las moléculas de dsRNA que inicialmente desencadenan el mecanismo, sugiriendo que el RNAi puede también actuar en la regulación génica de la célula hospedadora.

Mecanismo de la interferencia génica mediada por RNA

Los datos disponibles hasta el momento (**Figura 4**) ponen de manifiesto que moléculas de dsRNA, homólogas en secuencia al gen silenciado o interferido, desencadenan el mecanismo de interferencia mediada por RNA (10). La molécula inicial de dsRNA es procesada por la RNAsa DICER, perteneciente a la familia de las endorribonucleasas de tipo III que específicamente procesan dsRNAs, originando pequeños fragmentos de 21-25 nucleótidos (nt). A continuación, estos pequeños duplex de RNA, denominados siRNAs, son incorporados al complejo denominado RISC con objeto de guiar nuevos ciclos de degradación específica del RNA. El complejo RISC contiene una endorribonucleasa probablemente distinta a DICER. Esta endorribonucleasa utiliza la secuencia codificada por la cadena antisentido de los siRNAs para encontrar y destruir mRNAs de secuencia complementaria. De esta manera, los siRNAs actúan como guías de las ribonucleasas para que degraden únicamente RNAs complementarios a una de las cadenas de los siRNAs. Por lo tanto, la especificidad de este mecanismo de defensa esta basado en el apareamiento de bases entre el siRNA y el RNA

diana, hecho que lo diferencia del sistema inmune en donde el reconocimiento es peptídico. Al igual que el sistema inmune de los vertebrados, la maquinaria del RNAi dispara una respuesta inicial mediante el reconocimiento de moléculas intrusas y una posterior estabilización y amplificación de la respuesta. En *C. elegans* y en plantas, los siRNAs pueden funcionar como oligonucleótidos cebadores de una polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que sintetiza dsRNAs adicionales, que son posteriormente procesados originando nuevos siRNAs. Esto permite la realización de ciclos de "dicing" y nuevos apareamientos, y como consecuencia una amplificación de la respuesta frente a las moléculas parásitas.

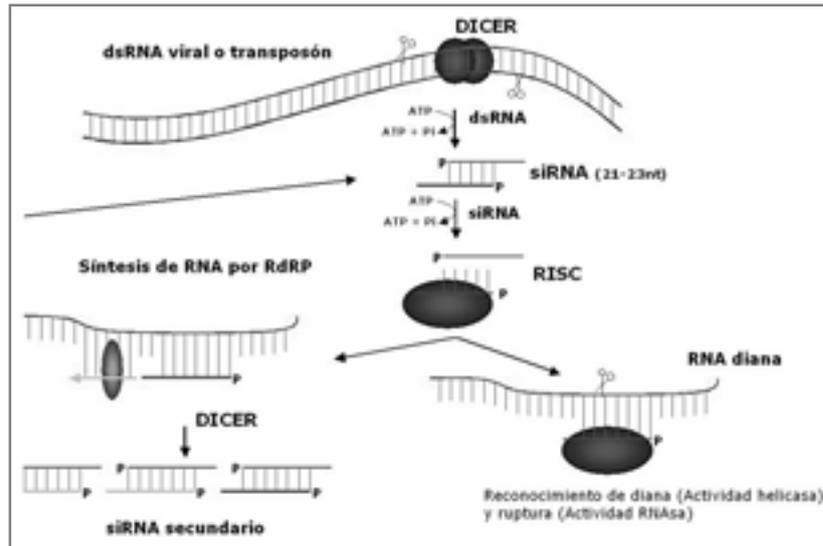


Figura 4. Mecanismo de la interferencia génica mediada por RNA.

El descubrimiento de que el duplex de RNA de 21nt de longitud es un mediador de la interferencia génica mediada por RNA en células de mamífero, ha permitido expandir el uso del RNAi (13). Estos autores han demostrado que la transfección en células de mamífero con duplex de RNA de 21nt sintéticos inhibe de una manera específica la expresión de genes endógenos. Además, estos autores también han demostrado que estos siRNAs son demasiado cortos como para desencadenar la respuesta no específica frente a dsRNAs mediada por la proteína quinasa (PK), en la cual el silenciamiento post-transcripcional se produce por la fosforilación del factor eIF-2 α . Tampoco inhiben, de forma inespecífica, la traducción. La posibilidad de aplicar el RNAi en células de mamífero va a posibilitar no solo el estudio de la función génica sino que también ha abierto nuevas posibilidades a la Terapia Génica.

Utilización de la interferencia génica mediada por RNA para la inhibición de la expresión de genes esenciales para la replicación viral

Recientemente y de forma independiente, varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad que los siRNAs, sintetizados químicamente, tienen de forma específica para inhibir la replicación del VIH-1 (14). El VIH es un virus RNA y por lo tanto utiliza intermediarios de RNA durante su replicación. Con la demostración de que los siRNAs podían funcionar en células de mamífero, era evidente que —para los virólogos— el paso siguiente debía de ser verificar si estos siRNAs eran capaces de inhibir la replicación de diferentes virus, entre ellos el VIH (**Figura 5**).

Descubrimientos recientes llevados a cabo en diversos laboratorios, entre los cuales se encuentra el Laboratorio de Retrovirología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de la Fundación IrsiCaixa, han puesto de manifiesto que la interferencia mediada por RNA puede llegar a ser una nueva estrategia terapéutica que permita activar un mecanismo de defensa intracelular contra el VIH. Estos trabajos han demostrado que la transfección transitoria de siRNAs dirigidos frente diversos genes del VIH (*p24*, *pol*, *tat*, *vif*, *nef*, etc.) inducen la degradación del RNA viral antes de su integración y como consecuencia reducen la producción de antígenos virales por parte de la célula infectada. También se ha demostrado que los siRNAs son efectivos en etapas más tardías de la replicación viral como es la degradación de transcritos virales producidos tras la integración del provirus en el genoma celular. Alternativamente, se ha generado un sistema, bajo un promotor de la RNA polimerasa III de mamíferos, capaz de expresar siRNAs funcionales denominados “*short hairpin*” RNAs (shRNA) (15). La co-transfección de plásmidos conteniendo este sistema junto con un clon infeccioso del VIH (pNL4-3), induce una marcada reducción ($4\log_{10}$) en la producción del virus. Estos sistemas —o sistemas alternativos— deberán permitir un silenciamiento génico estable en las células diana y potencialmente en organismos enteros. En su conjunto, todos estos trabajos mencionados ponen de manifiesto que el fenómeno de RNAi puede ser un abordaje interesante en la Terapia Génica de la infección por el VIH.

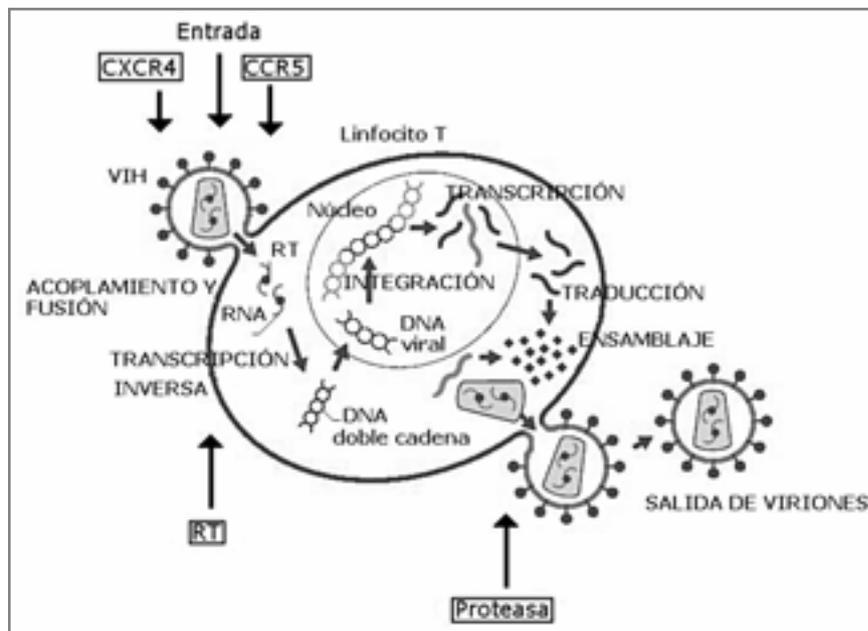


Figura 5. Utilización de la interferencia génica mediada por RNA para la inhibición de la expresión de genes esenciales para la replicación viral (CXCR4, CCR5, RT, proteasa).

Un aspecto interesante del fenómeno del RNAi es como afectará la alta variabilidad genética del VIH al silenciamiento génico mediado por siRNAs. Este virus al igual que el resto de los virus RNA no posee actividad correctora de copia y como consecuencia introduce una mutación cada 10^4 - 10^5 nucleótidos copiados. En el caso del VIH, que tiene un genoma de, aproximadamente, 10^4 nucleótidos, se introducirá, al menos, una mutación cada vez que se replique una molécula del RNA viral. Esta alta variabilidad genética hace que aparezcan virus con mutaciones en la región genómica diana, por lo que será muy fácil que escape al RNAi. En efecto, un reciente trabajo llevado a cabo en el Laboratorio de Retrovirología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de la Fundación IrsiCaixa, ha puesto de manifiesto que una única mutación en la región diana es suficiente para permitir al VIH

escapar del silenciamiento génico mediado por siRNAs (16). Para contrarrestar esta debilidad de los siRNAs se propone la co-expresión de múltiples siRNAs dirigidos contra regiones conservadas del virus, esperando que se produzca un efecto comparable al observado cuando se utilizan 3 o 4 drogas antirretrovirales de alta actividad (*"highly active anti-retroviral treatment"*) o HAART. La combinación de múltiples siRNAs podría dar lugar a los llamados siRNAs de alta actividad (*"highly active anti-retroviral gene silencing"*) o HAAGS.

También se ha demostrado que los genes celulares pueden ser una diana más atractiva que los propios genes virales. Novina y colaboradores (17) han mostrado que ciertos siRNAs dirigidos contra el gen que codifica el receptor celular CD4 reduce en 8 veces la expresión de este receptor en la superficie celular. Obviamente, estas células, en las cuales la expresión del receptor CD4 esta fuertemente inhibida, serán más refractarias a una infección por el VIH. Más relevante aún es el hecho de que en este trabajo se demuestra también que un receptor celular puede ser una diana para su bloqueo mediado por un RNAi. Un aspecto muy interesante que han puesto de manifiesto estos experimentos es la importancia de la vida media de la proteína cuando se está evaluando la eficacia del silenciamiento génico mediado por RNAi. Por ejemplo, en experimentos *ex vivo*, proteínas presentes en la superficie celular podrían continuar respondiendo a estímulos o actuar como receptores para el VIH, a pesar de la supresión de su mRNA, hasta que la proteína fuese eliminada de la superficie celular en ausencia de síntesis *de novo*. Ahora bien, la utilización de genes celulares, tales como el que codifica el receptor CD4, podría tener un uso muy limitado si tenemos en cuenta lo esencial de su función. Se propone la utilización de dianas celulares anti-VIH que pueden ser más atractivas. En particular, la molécula CCR5 ya que se ha comprobado que individuos homocigotos para una mutación que inutiliza esta molécula son refractarios a la infección por el VIH. Efectivamente, en el Laboratorio de Retrovirología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de la Fundación IrsiCaixa se ha demostrado que el silenciamiento génico, mediado por siRNAs, de los receptores de quimioquinas, CXCR4 y CCR5, impide la expresión de estas moléculas en la superficie celular y por ende que sean utilizadas por el VIH como co-receptores lo que impide, de forma indirecta, la replicación del virus (18).

El fenómeno de la interferencia mediada por RNA es, sin lugar a dudas, una nueva área de investigación que no esta restringida al VIH. El silenciamiento génico ha sido también evaluado con poliovirus, con el virus respiratorio sincitial (RSV), con el virus del papiloma humano (HPV) y con el virus de la hepatitis C (VHC) entre otros, y podría ser fácilmente extensible a otros virus. En conclusión, el silenciamiento génico mediado por RNA de genes virales o celulares constituye un descubrimiento de gran relevancia que va más allá de la investigación antiviral y que, como se ha mencionado a lo largo de este capítulo, tiene numerosas aplicaciones tanto en la investigación básica como aplicada.

Referencias

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305: 1425-31.
2. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 373: 123-6.
3. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. Science 242: 1168-71.
4. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, Emini EA, Chodakewitz JA (1997) Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. N Engl J Med 337: 734-9.
5. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD (2006) Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. Top HIV Med 14: 125-30.
6. Ibañez A, Puig T, Elias J, Clotet B, Ruiz L, Martinez MA (1999) Quantification of integrated and total HIV-1 DNA

- after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *Aids* 13: 1045-9.
7. Martínez MA, Cabana M, Ibanez A, Clotet B, Arno A, Ruiz L (1999) Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in patients with prolonged suppression of plasma viremia. *Virology* 256: 180-7.
 8. Martínez MA, Clotet B, Este JA (2002) RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol* 23: 559-61.
 9. Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-70.
 10. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.
 11. Li H, Li WX, Ding SW (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296: 1319-21
 12. Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT (2005) Evidence that HIV-1 encodes a siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22: 607-19.
 13. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-8.
 14. Stevenson M (2004) Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 351: 1772-7.
 15. Lee SK, Dykxhoorn DM, Kumar P, Ranjbar S, Song E, Maliszewski LE, Francois-Bongarcon V, Goldfeld A, Swamy MN, Lieberman J, Shankar P (2005) Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV. *Blood* 106: 818-26.
 16. Sabariego R, Gimenez-Barcons M, Tapia N, Clotet B, Martínez MA (2006) Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs. *J Virol* 80: 571-7.
 17. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA (2002) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8: 681-6.
 18. Martínez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J, Clotet B, Este JA (2002) Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *Aids* 16: 2385-90.

CAPÍTULO 12

Estrategias de Terapia Génica para el tratamiento del cáncer

Cristina Fillat

El cáncer sigue siendo, en la actualidad, uno de los principales problemas de salud ante el que como sociedad nos enfrentamos. Ello se debe en parte porque, si bien en los últimos años se han producido grandes avances en la comprensión de las alteraciones moleculares y morfológicas de muchas de las neoplasias, todavía se ha avanzado poco en la identificación de terapias curativas. Las terapias tradicionales basadas en la cirugía, no siempre pueden aplicarse y las basadas en la quimio- y la radioterapia presentan una eficacia limitada y un gran número de efectos adversos asociados. La Terapia Génica en cáncer intenta desarrollar terapias que sean eficaces inductores de la muerte celular y altamente selectivas para la célula tumoral con el fin de aumentar la eficacia y minimizar los efectos colaterales (**Figura 1**). En este trabajo se presentan las principales estrategias de Terapia Génica antitumoral que se están estudiando en ensayos preclínicos, y que se basan en la bioactivación intratumoral de prodrogas y más concretamente el sistema timidina quinasa/ganciclovir. Se detallan los resultados de nuevas terapias basadas en la Terapia Génica y su eficacia antitumoral en modelos de adenocarcinoma de páncreas.

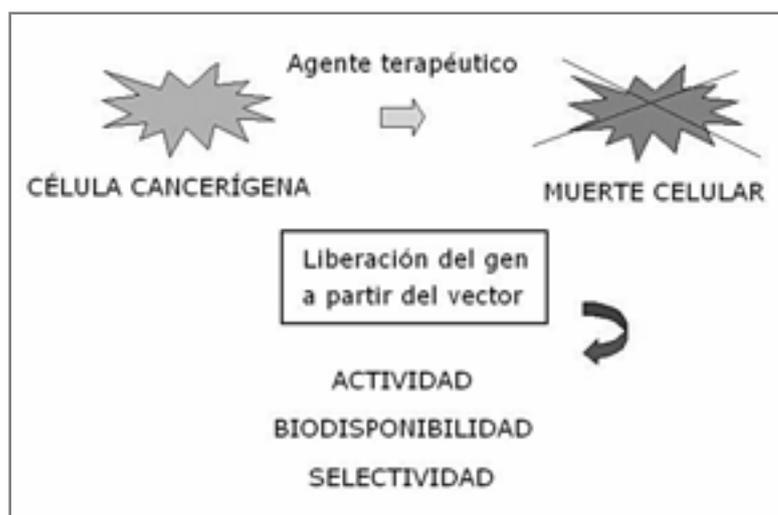


Figura 1. Estrategia general de la Terapia Génica para el cáncer.

Terapia Génica y cáncer

El cáncer se considera una enfermedad genética consecuencia de un acúmulo de mutaciones que capacitan a las células tumorales para nuevas funciones con ventajas proliferativas, de supervivencia, invasividad y migración.

El reto de las terapias antitumorales no es nada fácil ya que no es suficiente con que el agente terapéutico alcance unas pocas células sino que debe eliminar todas las células tumorales, y no sólo en el tumor primario sino también en las posibles metástasis.

Los avances en las tecnologías de transferencia génica conjuntamente con la identificación molecular de genes diana en cáncer, han permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la Terapia Génica. Una de las particularidades de la Terapia Génica se halla en que el agente terapéutico está constituido por dos componentes, por un lado un gen diana que capacitará a las células para funciones antitumorales y un vector de transferencia que

permitirá la entrada, más o menos eficiente, de este gen a las células tumorales. La manipulación de ambos componentes es lo que debe conferir al producto una potencia suficiente para eliminar las células y a su vez con una selectividad para que actúe únicamente sobre las células tumorales.

De acuerdo con esas premisas y desde el punto de vista de los genes diana las estrategias más comunes que se están ensayando consisten en:

- Inhibición de la expresión de oncogenes
- Restablecimiento de la expresión de genes supresores de tumor
- Aplicación de genes bioactivadores de prodrogas o genes suicidas
- Inhibición de la angiogénesis tumoral
- Activación del sistema inmune
- Viroterapia como concepto general

Genes bioactivadores de prodrogas o genes suicidas

Esta estrategia se basa en la transferencia de genes bioactivadores de prodrogas (también llamados genes "suicidas") a las células tumorales (**Figura 2**). Dichos genes codifican proteínas capaces de metabolizar prodrogas no tóxicas y convertirlas en metabolitos inductores de muerte celular. En la aplicación de esta terapia se requieren dos etapas. En primer lugar, será necesario introducir el gen suicida a la célula tumoral y a continuación se administrará la prodroga que se metabolizará selectivamente en las células que expresen el gen suicida.

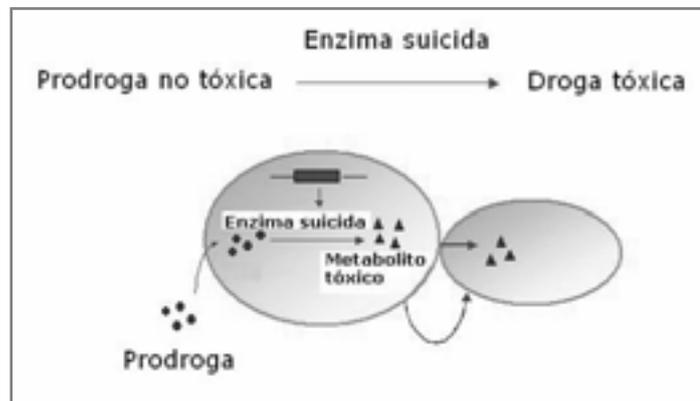


Figura 2. Genes bioactivadores de prodrogas o genes suicidas.

Un aspecto interesante de este tipo de terapias es que poseen un efecto colateral también llamado efecto adyacente. Este consiste en que los metabolitos tóxicos, una vez generados en una célula pueden viajar a células circundantes y aumentar así el área citotóxica. Esto se considera una ventaja de estos sistemas respecto a otros ya que permite ampliar el efecto a otras zonas próximas y no queda limitado a las áreas de transferencia génica. Los genes utilizados en este tipo de estrategia pueden tener diversos orígenes, desde el humano pasando por el viral y bacteriano, hasta la levadura. Los sistemas suicidas más utilizados se sumarian en la **Tabla I**.

El sistema suicida TK/GCV

Uno de los sistemas suicidas más estudiados es el que combina el gen de la timidina quinasa del virus Herpes simplex tipo 1 (TK) y la prodroga ganciclovir (GCV). Frederic Moolten fue el primero en describir el potencial del sistema TK/GCV, como agente antitumoral (1). El GCV

es un análogo acíclico del nucleósido natural 2'-deoxiguanosina que se utiliza como agente antiviral contra infecciones causadas por miembros de la familia herpesvirus, tales como el citomegalovirus (CMV), el HSV de tipo 1 y tipo 2, el virus de la varicela zoster y el virus de Epstein-Barr. El efecto antiviral tiene lugar cuando el GCV, una vez en el interior de la célula es fosforilado hasta convertirse en GCV trifosfato, que actúa como competidor del nucleótido 2'-deoxiguanosina trifosfato, inhibiendo así la síntesis de DNA. La enzima responsable de la primera etapa de fosforilación del GCV varía en función del virus que infecta la célula. En una infección por HSV-1 es la timidina quinasa (TK), enzima por la cual el GCV presenta una especificidad de sustrato tres órdenes de magnitud superior a cualquier otra quinasa celular humana. El GCV monofosfato es posteriormente convertido a GCV bifosfato por acción de la guanilato quinasa, y después hasta GCV trifosfato por acción de otras quinasas celulares tales como la fosfoglicerato quinasa. Dadas las similitudes estructurales que presenta con el nucleótido 2'-deoxiguanosina trifosfato, el GCV trifosfato es reconocido como sustrato de la DNA polimerasa δ y se incorpora, como un nucleótido más, a la síntesis de la cadena de DNA. Mientras que los grupos hidroxilo del GCV trifosfato, permiten la elongación de la cadena de DNA, la falta del anillo de azúcar lo convierte en un mal sustrato para continuar la síntesis lo que provoca una parada en la elongación poco después de su incorporación a la nueva cadena. Además, el GCV trifosfato es también un inhibidor de la propia DNA polimerasa δ impidiendo así la incorporación de nuevos nucleótidos. Después de varios ciclos en los que tiene lugar este proceso se acaban formando distintos puntos de ruptura en la doble cadena del DNA lo que activa los mecanismos efectores de la apoptosis celular por vías todavía poco conocidas (2).

Tabla I
Sistemas suicidas más utilizados en la Terapia Génica del cáncer

Enzima	Prodroga	Metabolito tóxico	Citotoxicidad
Timidina quinasa (TK)	Ganciclovir (GCV)	Ganciclovir trifosfato (GTP)	<ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de GTP al DNA • Inhibición de la DNA polimerasa
Citosina deaminasa (CD)	5-fluorocitosina	5-fluorouracilo	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la timidilato sintasa
Citocromo P4502B1 (CYP2B1)	Ciclofosfamida	Acroleína + mostaza de fosforamida	<ul style="list-style-type: none"> • Intercalamientos en el DNA
Nitrorreductasa (NTR)	5-aziridinil-2,4-dinitrobenzamida (CB1954)	5-aziridil-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida	<ul style="list-style-type: none"> • Intercalamientos en el DNA
Carboxilesterasa (CE)	Iriotecan (CPT-11)	SN-38	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la topoisomerasa I
Fosforilasa nucleosídica de purinas (CeoD)	6-metilpurin-2-deoxinucleósido (MeP)	6-metilpurina	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la incorporación de uridina al RNA • Inhibición de la incorporación de leucina a las proteínas • Inhibición de la síntesis de DNA

Estudios preclínicos y ensayos clínicos

Fue en el año 1992 cuando se inició el primer ensayo clínico utilizando el sistema TK/GCV para el tratamiento de 15 pacientes con tumores cerebrales refractarios a las distintas terapias convencionales. Desde entonces hasta hoy se han desarrollado un gran número de sistemas y lo que se puede concluir es que es posible transferir de forma segura el gen de la timidina quinasa mediante la inyección intratumoral de vectores retrovirales o adenovirales, y que la administración de GCV, después de la transferencia del gen suicida, no comporta una toxicidad significativa. Sin embargo, a excepción de algunos pocos casos en los que se han conseguido regresiones parciales de los tumores, la eficacia de dicha terapia es limitada.

Estrategias encaminadas a mejorar la eficacia del sistema TK/GCV

La variabilidad en la respuesta al sistema TK/GCV puede responder a diversos motivos que obedecen por un lado a la diferente sensibilidad de las células tumorales a esta terapia pero también a las limitaciones intrínsecas de los vectores actuales en Terapia Génica que permiten únicamente el acceso a un área limitada del tumor.

Se ha trabajado en el desarrollo de estrategias capaces de ampliar la citotoxicidad del sistema TK/GCV mediante distintas aproximaciones en modelos de cáncer de páncreas:

- Aumento del efecto adyacente del sistema TK/GCV
- Inducción de la capacidad de transducción a la proteína TK
- Combinación con la lisis adenoviral

El efecto adyacente del sistema TK/GCV se describió, por primera vez, en el año 1990, cuando Moolten y Wells observaron que células transducidas con el gen de la TK y tratadas con GCV, eran capaces de conferir quimiosensibilidad a células vecinas no transducidas (3). Actualmente, se sabe que para que este efecto tenga lugar es necesario que las células estén en contacto físico, lo que descarta que el aumento en la citotoxicidad sea consecuencia de la difusión de metabolitos tóxicos. El mecanismo subyacente a este fenómeno se explica por el tránsito intercelular de las formas fosforiladas de GCV a través de las uniones intercelulares llamadas *gap*. Estas uniones son zonas de comunicación intercelular formadas por canales transmembrana a través de los cuales se transportan moléculas de tamaño no superior a los 2000 Da. Cada canal está formado por dos conexiones, una por cada célula de contacto y a su vez, dichas conexiones están formadas por seis proteínas llamadas conexas (**Figura 3**).

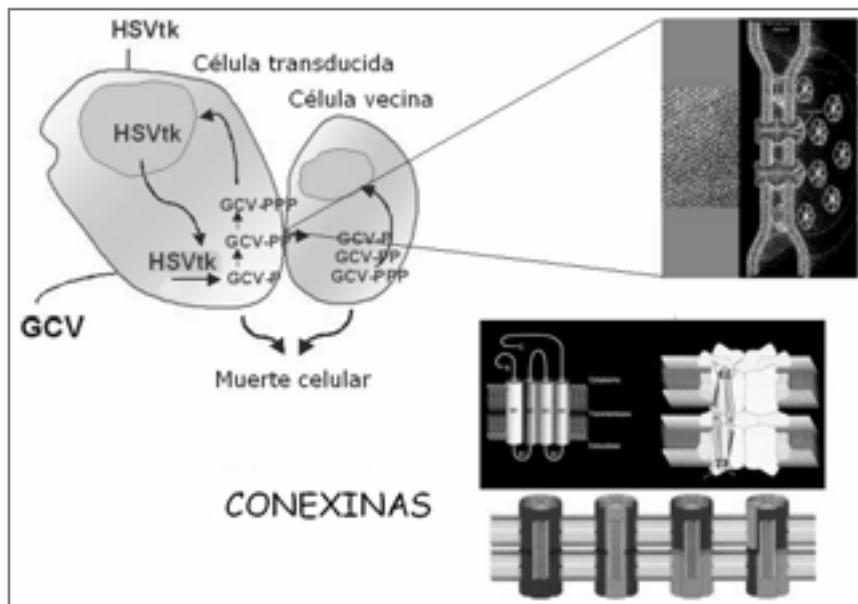


Figura 3. Efecto adyacente del sistema TK/GCV a través de conexas.

Se sabe que en los tumores las células neoplásicas se comunican mal con las del entorno y se independizan, por lo que hay una pérdida de uniones intercelulares y una subexpresión de las conexas.

Teniendo en cuenta estas premisas, se ha estudiado si el restablecimiento de las uniones *gap* en tumores pancreáticos, por reintroducción del gen de la conexina 26 (Cx26) podría modificar la sensibilidad del sistema TK/GCV. Los resultados mostraron que, en efecto, al introducir el gen de la Cx26, en la mayoría de células estudiadas aumentaba el número de uniones *gap*, y en algunos casos había un incremento de la sensibilidad al sistema TK/GCV que se podía atribuir a un mayor efecto adyacente del sistema (4). Mediante esta estrategia se conseguía vehicular los metabolitos tóxicos a un mayor número de células tumorales y en consecuencia obtener un mayor efecto terapéutico. Otros investigadores en otros modelos y con otras conexas demuestran datos similares (5).

Con el objeto de conferir la capacidad de transducción a la proteína TK, se ha modificado la proteína TK de forma que en su extremo amino terminal se dispone un dominio de transducción de proteínas (PTD) derivado de la proteína Tat del VIH, el dominio Tat8. Se ha descrito que existen unas secuencias peptídicas que poseen capacidad para unirse a las membranas celulares y transportar al interior de la célula fragmentos asociados (6). Hay varios PTDs propuestos y hay mucha discusión alrededor de los mecanismos de acción implicados en este proceso y en particular de si así como facilitan la entrada a la célula serían o no capaces de facilitar su salida. Se ha identificado un nuevo péptido, de 8 aminoácidos derivado de la proteína Tat, que de forma similar a otro de 11 aminoácidos, que había sido descrito anteriormente, posee capacidad de transducción de las células. El mecanismo propuesto consiste en que la proteína Tat8TK, expresada en la célula tumoral después de ser modificada genéticamente, en combinación con el GCV, indujera, en primer lugar, la muerte de estas células y posteriormente como consecuencia de la lisis celular permaneciera en el medio extracelular. A través del dominio Tat8 podría, desde allí, entrar en nuevas células vecinas, que al recibir la proteína Tat8TK también morirían por la acción combinada con el GCV. Este sistema se ha visto que permite una amplificación del sistema suicida TK/GCV y aumenta su eficacia antitumoral en modelos de adenocarcinoma de páncreas (7).

Respecto a la tercera aproximación, es decir, la combinación con la lisis adenoviral, se basa en la aplicación de dos sistemas de inducción de muerte celular con diferentes mecanismos como son el sistema TK/GCV y la lisis adenoviral. Los resultados no siempre han sido los óptimos dada la interferencia del GCV con la replicación viral (8). El grupo de Fillat y colaboradores ha trabajado en un diseño mejorado de esta combinación y se dispone de datos en los que se demuestra que la pauta de administración del virus replicativo más GCV es determinante en la respuesta antitumoral de esta estrategia.

Vectores génicos: El adenovirus humano tipo 5

Tal y como se hacía referencia al principio de este capítulo, en Terapia Génica el producto terapéutico está compuesto de dos elementos, los genes diana y los vectores. La eficacia antitumoral va a depender no sólo del uso de buenos genes candidatos sino también de los vectores adecuados.

Ahora nos fijaremos con más detalle en cómo podemos modular los vectores para hacerlos más eficaces en la transferencia génica.

En cáncer, está claro que el objetivo es hacer llegar el gen terapéutico al máximo número de células tumorales para eliminarlas. En este sentido, los vectores virales son los candidatos más interesantes ya que está demostrada su ventaja en cuanto a su mayor eficacia de transferencia en relación con los vectores no virales. De entre los vectores virales los adenovirus destacan por transferir el gen (transducir) de modo muy eficiente a las células epiteliales pues éstas expresan el receptor primario del virus llamado Receptor Coxsackie-Adenovirus o CAR. La mayoría de tumores sólidos derivan de células epiteliales, por lo que cabría pensar que el adenovirus puede ser un vector ideal para introducir genes a células tumorales. Aún así, en los últimos años se ha visto que hay muchos tumores en los que la expresión de CAR está reducida, y ello limita la infectividad del adenovirus (**Figura 4**).

Se han descrito un total de 50 serotipos adenovirales, si bien el adenovirus tipo 5 humano es el más utilizado en Terapia Génica. Ello se debe en parte a su baja patogenicidad ya que se le asocia ocasionalmente a patologías leves de las vías respiratorias.

Los adenovirus no presentan envuelta lipídica y sí una cápsida icosaédrica de unos 80 nm de diámetro formada por ocho proteínas estructurales (II, III, IIIa, IV, IVa2, VI, VIII y IX), siendo las mayoritarias la proteína del hexón (II), la proteína del pentón (III) y la proteína

de la fibra (IV). El genoma del virus consiste en una doble cadena de DNA lineal de 36 Kb, unida covalentemente por los extremos 5' a la proteína terminal y flanqueada por unas regiones llamadas *Inverted Terminal Repeats* (ITRs).

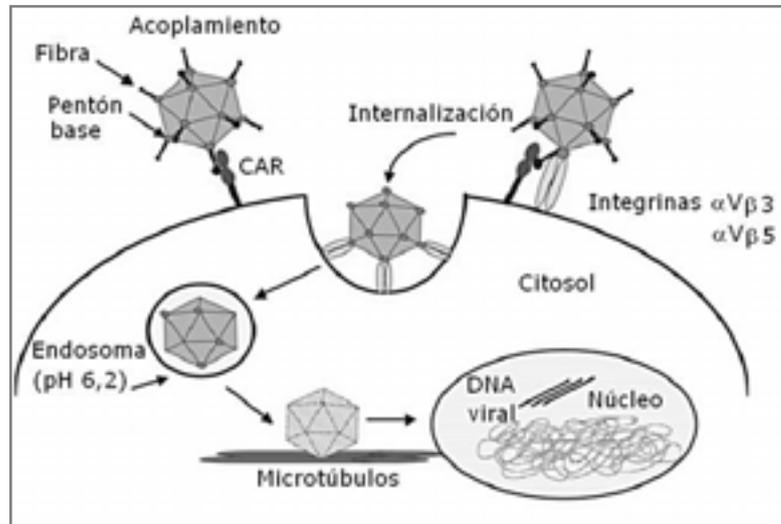


Figura 4. Vectores adenovirales de transferencia génica en células epiteliales a través del receptor primario CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor).

En una infección adenoviral la primera etapa que sucede es el reconocimiento y posterior interacción del dominio “knob” (protuberancia redondeada), situado en el extremo C-terminal de la proteína de la fibra del virus, con el receptor primario de la membrana celular, que para el adenovirus humano serotipo 5 es el receptor CAR. Con ello se produce un acercamiento del virus a la célula que permite la interacción de la base de la proteína del pentón con los receptores secundarios, las integrinas $\alpha V/\beta$ situadas en la membrana plasmática. Una vez fijado el virus a la superficie de la célula, éste se internaliza vía endocitosis, escapa del endosoma y el DNA viral llega —con la colaboración de los microtúbulos del citoesqueleto celular— al núcleo donde se mantiene de forma episomal (9).

Modificación del tropismo adenoviral

La entrada de un adenovirus a una célula va a estar muy relacionada con la expresión del receptor CAR en la membrana de la célula de interés. Si bien en células epiteliales la expresión del receptor CAR es muy alta en tumores de origen epitelial su expresión se pierde cuando éstos están ya muy desdiferenciados (10). Ello limita la eficacia de entrada de los adenovirus y en consecuencia hay varias investigaciones dirigidas a modificar el tropismo de los adenovirus con el objetivo de redirigir su entrada hacia receptores muy expresados en células tumorales. Fundamentalmente se están usando cuatro estrategias distintas (**Figura 5**):

- Modificación genética de la cápsida y conjugación de ésta con complejos proteicos. La ventaja de la modificación genética es que es más fácil conseguir grandes cantidades de vector y que la progenie presente la mutación. Sin embargo, esta estrategia se ve limitada por la desestabilización de la fibra viral cuando se insertan secuencias peptídicas exógenas. De momento sólo se han podido insertar pequeños péptidos.
- Pseudotipaje que se refiere al uso de adenovirus con un genoma de un serotipo y cápsida de otros serotipos diferentes que reconocen otros receptores distintos a CAR.
- Mosaicismo complejo que combina el pseudotipaje con la inserción de ligandos específicos.

- Conjugación con ligandos que cambian el tropismo de la cápsida viral. El factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2) es un ligando que se ha usado para dirigir el adenovirus específicamente a la célula tumoral. El FGF2 se une a la cápsida tras haber sido conjugado químicamente a un anticuerpo dirigido contra el dominio "knob" de la fibra del adenovirus (11). Entre las ventajas de este diseño, se incluyen el bloqueo del tropismo natural del virus y el hecho de redirigirlo específicamente hacia células que expresan los receptores de FGF de alta afinidad como vía de entrada. Dado que los receptores de FGF se hallan sobre-expresados en una gran proporción de tumores, así como en el endotelio angiogénico, esta modificación del tropismo lleva a los adenovirus precisamente a las células diana deseadas (12).

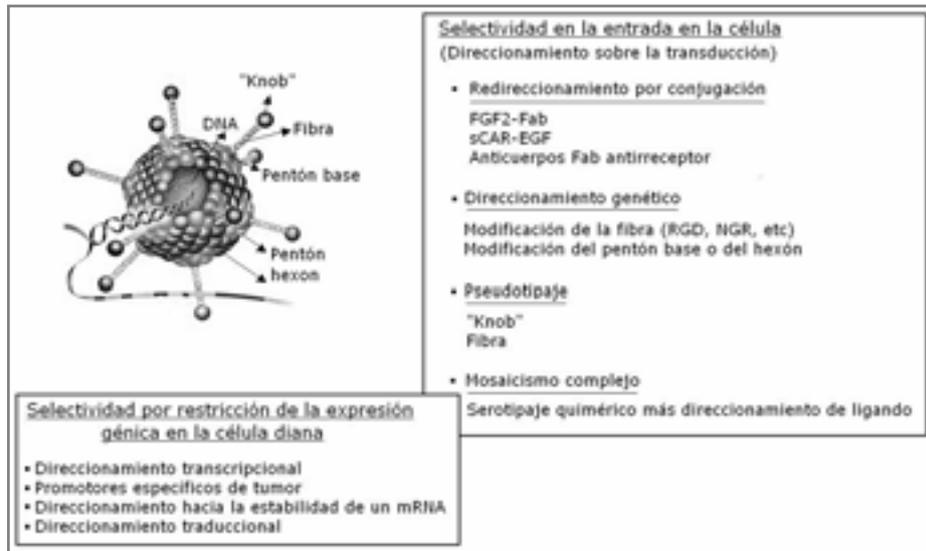


Figura 5. Estrategias para modificar el tropismo del vector adenoviral.

Precisamente el grupo de Fillat y colaboradores, ha trabajado con este modelo de redirección adenoviral y se dispone de datos que muestran la elevada eficacia de este sistema para redirigir los adenovirus a tumores pancreáticos. Además, se ha estudiado la capacidad de los adenovirus redirigidos a receptores FGFR que expresan el gen citocromo P4502B1 en combinación con ciclofosfamida, para inducir regresión en el crecimiento tumoral. Estos estudios, realizados en modelos de neoplasia pancreática, demuestran una mayor capacidad antitumoral por parte de los adenovirus así redirigidos y que se asocia a una mayor supervivencia de los animales.



Figura 6. Terapia Génica para el cáncer que se basará en el uso de modificaciones genéticas sobre sistemas suicidas y modificaciones en el tropismo de vectores adenovirales para aumentar la eficacia antitumoral, pero en combinación con terapias multimodales.

En resumen, las estrategias de Terapia Génica para el cáncer se basan en el uso de modificaciones genéticas sobre sistemas suicidas y modificaciones en el tropismo de los vectores adenovirales que permiten mejorar la eficacia antitumoral. Es importante señalar también que para ganar la batalla contra el cáncer éstas, junto con muchas otras que se van estudiando, son estrategias a considerar y que sin duda va a ser la aplicación de terapias multimodales lo que pueda proporcionar una mayor esperanza en el futuro (**Figura 6**).

Referencias

1. Moolten FL (1986) Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*, 46: 5276-81.
2. Fillat C, Carrió M, Cascante A, Sangro B (2003) Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther*, 3: 13-26.
3. Moolten FL, Wells JM (1990) Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst*, 82: 297-300.
4. Carrió M, Mazo A, López-Iglesias C, Estivill X, Fillat C (2001) Retrovirus mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 94: 81-8.
5. Takada T, Yamasaki H, Mesnil M (2001) Induction of a bystander effect in HeLa cells by using a bigenic vector carrying viral thymidine kinase and connexin32 genes. *Mol Carcinog*, 30: 176-80.
6. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 664-8.
7. Cascante A, Huch M, García Rodríguez L, González JR, Costantini L, Fillat C (2005) Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo. *Hum Gene Ther*, 16: 1377-88.
8. Wildner O, Morris JC (2000) The role of the E1B 55kDa gene product in oncolytic adenoviral vectors expressing herpes simplex virus-TK: assessment of antitumor efficacy and toxicity. *Cancer Res*, 60: 4167-74.
9. Curiel DT, Douglas JT (2002) Adenoviral vectors for gene therapy. Academic Press. USA.
10. Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AL, Tseng CP, Wang Z, Hsieh JT (1999) Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res*, 59: 325-30.
11. Doukas J, Hoganson DK, Ong M, Ying W, Lacey DL, Baird A, Pierce GF, Sosnowski BA (1999) Retargeted delivery of adenoviral vectors through fibroblast growth factor receptors involves unique cellular pathways. *FASEB J*, 13: 1459-66.
12. Wang W, Zhu NL, Chua J, Swenson S, Costa FK, Schmitmeier S, Sosnowski BA, Shichinohe T, Kasahara N, Chen TC (2005) Retargeting of adenoviral vector using basic fibroblast growth factor ligand for malignant glioma gene therapy. *J Neurosurg*, 103: 1058-66.

CAPÍTULO 13

Transferencia de genes angiogénicos y antiangiogénicos

Susana Olmedillas

Se denomina angiogénesis al proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes (1). El término fue acuñado en 1737 por un cirujano británico, John Hunter, quien lo empleó por primera vez para referirse al crecimiento de los vasos sanguíneos en la cornamenta del reno. Sin embargo, el fenómeno en sí no fue descrito hasta 1935, durante el estudio realizado por Arthur Tremain Hertig sobre el desarrollo de la placenta en primates (2). En la **Figura 1** se resumen los acontecimientos más relevantes en la investigación dentro del campo de la angiogénesis.

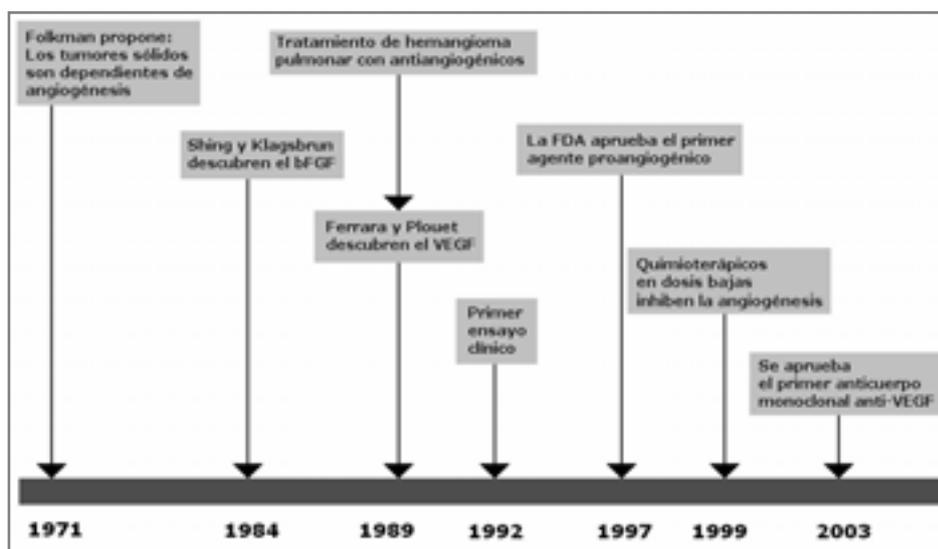


Figura 1. Principales hitos históricos de la angiogénesis (Adaptado Ref. 2).

El proceso de la angiogénesis transcurre a través de varias fases, la primera de las cuales es la activación de las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos pre-existentes, para que comiencen a proliferar, migrar y expandirse. A continuación tiene lugar la degradación de la matriz extracelular y la organización del nuevo lumen. Todos estos acontecimientos están determinados por el balance neto entre factores reguladores pro y antiangiogénicos, que son liberados por las CE activadas, los monocitos, las células musculares lisas y las plaquetas (3).

La angiogénesis se produce tanto en estados fisiológicos como en los patológicos tales como la proliferación del endometrio durante el ciclo ovárico, la cicatrización de las heridas, la recuperación tras un episodio de isquemia o los procesos metastásicos. En estas situaciones tiene lugar una vasodilatación, acompañada de la extravasación de proteínas plasmáticas, que proporcionan un entramado provisional sobre el que migran las CE. Éstas, pierden el contacto entre sí y con la membrana basal mediante la acción de metaloproteinasas, responsables de la degradación de la matriz extracelular. Las células endoteliales se disponen formando un tubo hueco que es estabilizado por células musculares lisas o pericitos, que se sitúan a su alrededor, constituyendo redes tridimensionales de nuevos vasos sanguíneos (4,5).

La escasez de oxígeno por falta de riego sanguíneo local es la responsable de que el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) desencadene una respuesta angiogénica coordinada mediante la inducción de la expresión de factores de crecimiento endoteliales (**Figura 2**). La formación de nuevos vasos sanguíneos también puede dispararse a partir de

estímulos metabólicos, como la acidosis y el estrés oxidativo. Los factores de crecimiento que dirigen la proliferación y migración de las CE son los factores angiogénicos directos, y su secreción por las células reclutadas en las zonas de formación de los nuevos vasos es regulada por los llamados factores indirectos (4).

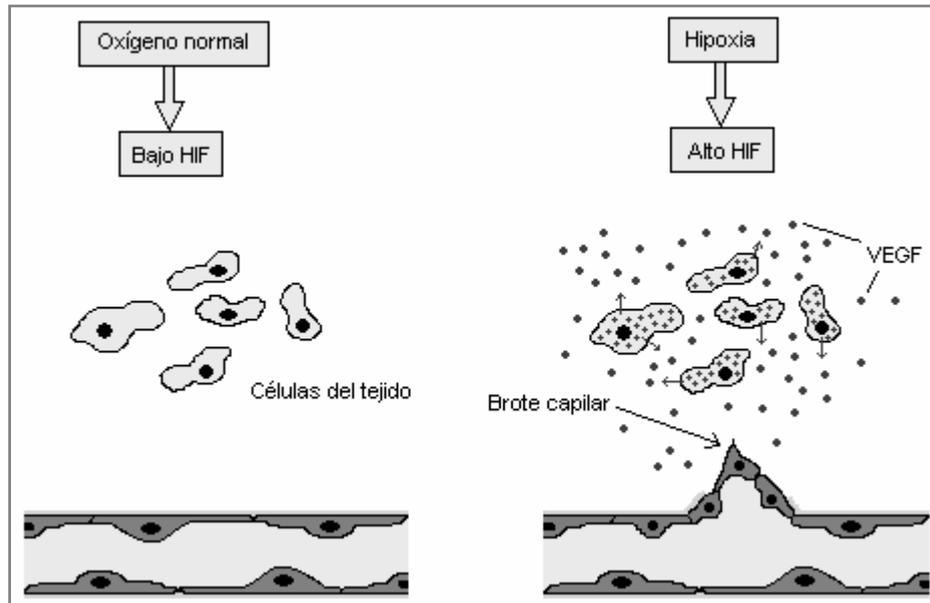


Figura 2. Regulación del crecimiento de vasos sanguíneos dependiente de la necesidad de oxígeno de las células del tejido adyacente (Modificado Ref. 6).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), cuya expresión se induce por el HIF, es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica. La administración conjunta de factores de la familia del VEGF y otros adicionales, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), da lugar a una neovascularización que resulta muy útil con fines terapéuticos. Por otra parte, los miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) atraen células mesenquimales a la pared de los vasos en formación, un mecanismo esencial para su muscularización. Para ello, los receptores de FGFs se expresan en las células endoteliales, en el músculo liso y en los mioblastos (4).

Dentro de la familia de las angiopoyetinas, destacan la angiopoyetina-1 (Ang-1), que estimula la interacción entre las CE y los pericitos, estabilizando las redes vasculares iniciadas por el VEGF en el adulto, y la Ang-2, que se expresa principalmente en los puntos de remodelación vascular fisiológicos y patológicos, contribuyendo a la estabilización de los vasos sanguíneos (4).

El factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) activa su receptor que se encuentra presente en las CE y en las células madre hematopoyéticas, estimulando la angiogénesis. De modo similar, los factores de crecimiento-1 y -2 semejantes a insulina (IGF-1 e IGF-2) ejercen diversas funciones, entre las cuales se incluyen la estimulación del crecimiento celular, la inhibición de la apoptosis y la inducción de la diferenciación celular. La expresión de los IGFs es inducida por la isquemia y el daño vascular, sugiriendo la posibilidad de que estos factores desempeñen funciones reparadoras. De acuerdo con esto, la administración de IGF-1 estimula la angiogénesis y la miogénesis, e induce la regeneración nerviosa después de una lesión, aunque su capacidad proangiogénica se considera menor que la de otros factores de crecimiento. Además, el IGF-1 en combinación con HGF, moviliza células madre del corazón dando lugar a la regeneración del tejido cardíaco (4).

Algunas señales químicas procedentes del sistema nervioso pueden dirigir el crecimiento vascular, como demuestra el hecho de que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimule la angiogénesis. Asimismo, el NGF también es sintetizado por las células endoteliales, ejerciendo efectos mitogénicos y antiapoptóticos sobre este tipo de células. También, el

factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son algunos ejemplos de citoquinas implicadas en el crecimiento y la estabilización vascular, mientras que otras, como la interleuquina-10 (IL-10), inhiben la angiogénesis. La trombina, por su parte, parece activar la cascada angiogénica mediante su interacción con integrinas de la superficie de las células endoteliales (4).

La desestabilización de los vasos sanguíneos formados es un proceso natural que acontece para poner fin al proceso angiogénico, una vez que se ha alcanzado un nivel de perfusión adecuado para la demanda metabólica. Es decir, cuando se han formado los vasos necesarios, intervienen mecanismos de compensación que detienen la cascada de la angiogénesis. Sin embargo, en ciertas situaciones patológicas, como la diabetes, las células endoteliales en proliferación mueren prematuramente por apoptosis, generando un círculo vicioso en el que se produce hipoxia, y la estimulación de las CE es ineficaz debido a la activación de mecanismos apoptóticos. De esta forma, la red capilar se altera y puede ocasionar un fallo orgánico. Diversos factores contribuyen a la desestabilización de los vasos: las trombospondinas que inhiben la angiogénesis actuando directamente sobre las células endoteliales y de forma indirecta sobre la producción de factores de crecimiento; la Ang-2 que actúa como desestabilizador cuando los niveles de VEGF son bajos; la proteína C reactiva, el quininógeno y el aniotensinógeno liberados por la acción de proteinasas, y diversas citoquinas que inhiben la angiogénesis y participan en la regresión vascular (4).

Aplicación de la Terapia Génica angiogénica en la regeneración de tejidos

La Terapia Génica consiste en introducir secuencias de DNA en células somáticas con fines terapéuticos mediante vectores de transferencia a través de procedimientos *in vivo* o *ex vivo* (7).

La angiogénesis es uno de los campos de aplicación más prometedores de la Terapia Génica, con el fin de transferir localmente factores de crecimiento vascular a los tejidos isquémicos y así promover la formación de nuevos vasos sanguíneos. En general, los expertos coinciden en la necesidad de optimizar las técnicas relacionadas con la angiogénesis terapéutica. Hoy día, los vectores que proporcionan una transferencia génica más eficaz son los adenovirales. Sin embargo, aunque menos eficaces, los vectores plasmídicos tienen altas posibilidades por su mayor seguridad para el paciente.

Los primeros ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes que no respondían a los tratamientos convencionales, se basaron en la transferencia del gen que codifica el FGF, demostrando que la angiogénesis terapéutica es segura, reduce los síntomas clínicos de trastornos como la angina de pecho, y mejora la función cardíaca. El objetivo del ensayo clínico de Terapia Génica angiogénica denominado AGENT, llevado a cabo por Grines y colaboradores, fue evaluar la seguridad y los efectos anti-isquémicos de cinco dosis crecientes de Ad5-FGF4 en pacientes con angina, y seleccionar las dosis apropiadas para estudios posteriores. Setenta y nueve pacientes con angina crónica estable se asignaron al azar en un ensayo doble ciego para administrarles placebo o el adenovirus tipo 5 con FGF4. Se demostró que una sola administración intracoronaria del Ad5-FGF4 era segura y no producía efectos adversos inmediatos. Se observó fiebre durante algunas horas en tres de los pacientes pertenecientes al grupo que recibió la dosis más alta. También se produjo una elevación transitoria y asintomática de las enzimas hepáticas en dos pacientes del grupo con menor dosis, pero no hubo diferencias significativas en los efectos secundarios observados durante el seguimiento posterior entre el grupo placebo y el que recibió el adenovirus. Los pacientes que recibieron el Ad5-FGF4 mostraron una clara mejoría en la resistencia al ejercicio a las cuatro semanas. Los resultados pusieron de manifiesto los efectos anti-isquémicos y la seguridad del tratamiento con Ad5-FGF4 comparados con el placebo. Por ello, esta estrategia se plantea como una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de la angina de pecho (8).

En octubre de 2006, MultiGene Vascular Systems inició en EEUU el reclutamiento de pacientes aquejados de una patología arterial periférica —consistente en la falta de riego sanguíneo en las extremidades inferiores debido al estrechamiento y la oclusión de las arterias— para un ensayo clínico de Fase I, cuyo objetivo era la aplicación con fines terapéuticos de una suspensión de células endoteliales y células musculares lisas, aisladas del propio paciente, cultivadas *in vitro* y modificadas genéticamente. En algunos casos, esta patología conlleva un daño tisular que conduce irreversiblemente a la gangrena de la extremidad y su amputación, por lo que, la estimulación de la angiogénesis mediante la inyección intracoronaria de células transfectadas con los genes del VEGF y la angiopoyetina-1, podría aumentar el flujo sanguíneo local y, con ello, el abastecimiento de oxígeno y nutrientes a los tejidos isquémicos. Este ensayo clínico de Fase I tiene como objetivo evaluar la seguridad y eficacia del tratamiento con MultiGeneAngio (nombre que recibe la suspensión celular) en los pacientes durante los próximos 15 años, así como establecer la dosis terapéutica más adecuada (9).

Douglas W. Losordo, de la Northwestern University, ha comenzado en julio de 2007 un ensayo clínico de Fase I de transferencia génica del phVEGF165, para promover la angiogénesis en pacientes con fallo cardíaco isquémico. El objetivo es evaluar la seguridad y la bioactividad de la inyección intramuscular del VEGF, mediante cateterismo, para transferir el gen directamente a la pared cardíaca. Este estudio es experimental y, aunque no hay pruebas de ello en humanos, está diseñado para promover la proliferación de nuevos vasos e incrementar el flujo sanguíneo a las áreas del corazón que no están suficientemente irrigadas. La proteína VEGF-165 estimula la división de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Tras la transferencia en músculo cardíaco, se administrará GM-CSF a los pacientes para estimular la movilización de las células madre de la médula ósea al torrente sanguíneo. Estas células madre pueden diferenciarse en células progenitoras endoteliales (CD34⁺) si reciben las señales apropiadas. Las células CD34⁺, que se desplazan a la zona del tejido cardíaco dañado, promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos —que suministrarán oxígeno y nutrientes— y aumentan, por tanto, la probabilidad de que la función cardíaca se recupere (10).

Por otra parte, el trasplante de células progenitoras endoteliales (EPCs) aisladas de sangre periférica en adultos, de la médula ósea o de la sangre del cordón umbilical, parece tener gran potencial para el tratamiento de dolencias cardiovasculares. En modelos animales de isquemia, el trasplante de células progenitoras endoteliales aumenta la neovascularización al estimular la diferenciación de células endoteliales maduras y la proliferación de éstas. Por tanto, estas observaciones sugieren que podría tratarse de una estrategia útil frente a las enfermedades isquémicas en humanos, pero es necesario resolver muchas dudas a este respecto antes de que el trasplante de EPCs pueda aplicarse de forma segura y rutinaria a los pacientes (4).

Lo que parece estar claro es que la Terapia Génica angiogénica y el trasplante de células progenitoras (Terapia Celular) podrían aplicarse de forma combinada para aprovechar las ventajas de ambas estrategias. La Terapia Génica *ex vivo* por su parte, sería el protocolo de elección ya que posibilitaría la repetición del procedimiento terapéutico en caso de nuevas lesiones que es algo habitual en patologías isquémicas.

Aplicación de la Terapia Génica contra el cáncer basada en la antiangiogénesis

Desde que Folkman propusiera, en 1971, que la angiogénesis es necesaria para el crecimiento tumoral, la investigación en este campo ha permitido determinar que un tumor sólido no puede crecer más de dos o tres milímetros sin el abastecimiento de nutrientes y oxígeno por parte de nuevos vasos sanguíneos. Por ello, la antiangiogénesis se perfila como una posible estrategia en la lucha contra el cáncer. Numerosas revisiones acerca del desarrollo de la Terapia Génica antiangiogénica frente al cáncer ponen de manifiesto la relevancia de transferir genes de efecto antiangiogénico a células tumorales o endoteliales,

para inhibir su migración y proliferación, impidiendo la formación de nuevos vasos y provocando la necrosis tumoral (1).

Los estudios más recientes en Terapia Génica antiangiogénica contra el cáncer utilizan más habitualmente como diana, las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos en vez de las células tumorales en sí mismas, debido a que las CE son mucho más estables genéticamente y, por ello, menos probable que acumulen mutaciones causantes de la aparición de resistencias o mecanismos de escape frente a los genes terapéuticos introducidos (3).

Hay una larga lista de genes candidatos para Terapia Génica antiangiogénica (4), entre los que destacan la trombospondina-1, la endostatina, la tumstatina, arrestina, canstatina, vastatina, restina, angiostatina, angiopoyetinas, interleuquinas, etc. La trombospondina-1 fue el primer inhibidor natural de la angiogénesis identificado, mientras que la endostatina (descubierta en 1997), es el mejor caracterizado. La tumstatina evita la angiogénesis por inhibición de la proliferación de las células endoteliales y la estimulación de la apoptosis. La arrestina y la canstatina, identificadas, por primera vez, en el año 2000, tienen efectos similares a los de la endostatina, al igual que ocurre con la vastatina y la restina. La angiostatina es un fragmento del plasminógeno que actúa como un potente inhibidor endógeno del crecimiento tumoral y de la metástasis, en modelos murinos de cáncer.

Tanaka y colaboradores (11) demostraron, por primera vez, la capacidad inhibidora del crecimiento y de la vascularización del factor plaquetario 4 (PF4) en gliomas intracerebrales, utilizando vectores retrovirales y adenovirales.

La proteína inducible por interferón-10 (IP-10) tiene efectos inmunomoduladores y antiangiogénicos. Tandle y colaboradores (3), mediante vectores retrovirales, transfectaron, en ratones "desnudos", células de melanoma humano con el gen de la proteína IP-10 obteniendo una notable reducción del crecimiento y de la vascularización tumoral.

Utilizando un vector adenoviral, Kim y colaboradores demostraron también que la expresión de un fragmento de 16 kDa de la prolactina en células de cáncer de próstata reduce notablemente su capacidad para formar tumores en un modelo murino de trasplante allogénico (12).

En 2005, Imagawa y colaboradores demostraron que la inyección intratumoral del gen de la interleuquina-12 (IL-12) provoca una reducción de la densidad vascular en modelos murinos de cáncer de cabeza y cuello (13). Otro hallazgo importante ha sido, por ejemplo, que el inhibidor de la ribonucleasa humana bloquea la angiogénesis mediante la formación de un complejo con su homólogo, la angiogenina, que es un factor proangiogénico. Así, Fu y colaboradores probaron que la transfección de células hematopoyéticas con el gen del inhibidor de la ribonucleasa humana reduce el crecimiento tumoral en un 47%, así como la densidad de vasos en el tumor, todo ello en modelos murinos (14). También, el gen asociado a la diferenciación del melanoma-7 (mda-7) actúa como un agente anticancerígeno multifuncional, con propiedades tanto proapoptóticas como antiangiogénicas, y su sobreexpresión mediada por adenovirus tiene efectos terapéuticos potenciales en el cáncer de pulmón en humanos (1). Nishikawa y colaboradores demostraron que la combinación de la Terapia Génica con el gen mda-7 y la radioterapia podría ser una estrategia factible y efectiva para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no escamosas (NSCLC) (15).

En cuanto a los vectores, se ha utilizado una gran variedad de ellos en Terapia Génica antiangiogénica, tanto no virales (DNA desnudo, oligonucleótidos antisentido, RNAs pequeños de interferencia o siRNAs, liposomas catiónicos), como virales (adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y lentivirus) (3).

El sistema de transferencia no viral más sencillo es la inyección directa de DNA libre, pero el producto génico suele tener una vida media muy corta debido a la degradación enzimática

in vivo y, además, la eficacia de transfección suele ser baja. La administración antitumoral de DNA plasmídico desnudo con el gen de la endostatina murina inhibe el crecimiento del carcinoma renal (16). Del mismo modo, la inyección intramuscular del gen de la endostatina retrasa de forma significativa el crecimiento de tumores cerebrales metastásicos (17). Sin embargo, en comparación con el DNA desnudo, los complejos de DNA plasmídico con liposomas son relativamente más estables y tienen mayor potencia de transfección (18).

La transferencia directa de DNA plasmídico a las células se lleva a cabo en muchos casos mediante electroporación, que consiste en la formación de poros en la superficie celular inducida por pulsos eléctricos. La electroporación *in vivo* es una estrategia de transferencia génica no viral que no induce respuesta inmune, es fácil de aplicar y da lugar a una elevada eficacia de transferencia. Uesato y colaboradores han demostrado el efecto antitumoral de genes antiangiogénicos como la angiostatina y la endostatina transferidos a tumores, por electroporación de bajo voltaje, en veintiséis modelos de cáncer de colon murino (19).

Los oligonucleótidos antisentido (AS-ODN) son moléculas sintéticas diseñadas para bloquear la traducción del RNA mensajero correspondiente al gen que se pretende silenciar. El AS-ODN entra en las células y migra al núcleo, donde hibrida de forma específica con el RNA mensajero diana, impidiendo que éste se procese en el ribosoma. Por otra parte, la hibridación entre el DNA introducido y el RNA mensajero estimula la producción, en ciertos tejidos, de una RNAsa-H específica de la secuencia diana, desencadenando su degradación (**Figura 3**). Las dos principales ventajas de los AS-ODN son, de una parte, su reducido coste de producción en grandes cantidades y, en segundo lugar, que no atraviesan la barrera hematoencefálica, por lo que su administración periférica no produce daños en el sistema nervioso central. Los AS-ODN se pueden inyectar directamente al paciente como "DNA desnudo", pero la eficacia de transferencia es mucho mayor cuando los oligonucleótidos se encuentran incorporados en liposomas catiónicos que no parecen presentar toxicidad hepática (20).

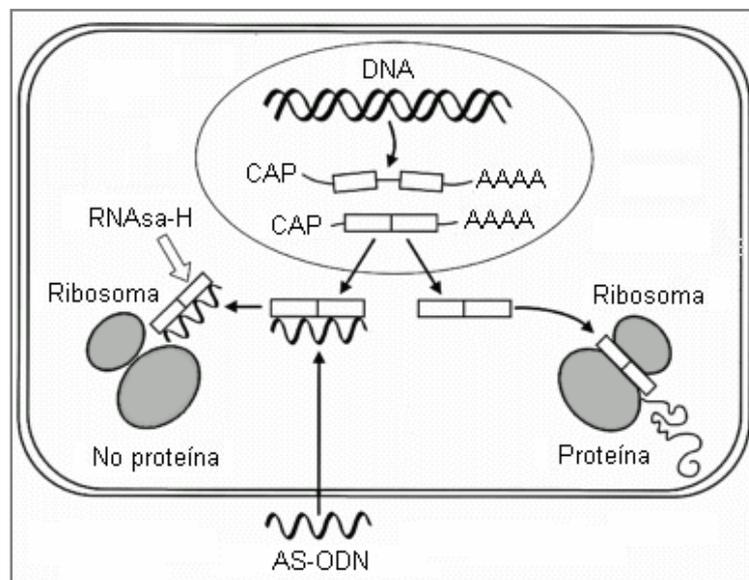


Figura 3. Inhibición mediada por oligonucleótidos antisentido (Modificado Ref. 20).

Al bloquear la traducción de los mensajeros que producen factores proangiogénicos puede inhibirse el crecimiento tumoral. Wang y colaboradores han conseguido reducir la expresión de VEGF en un 45% en una línea celular de osteosarcoma humano mediante la transducción de un plásmido de expresión eucariota que contenía VEGF antisentido, por lo que esta estrategia resulta prometedora en la Terapia Génica frente al cáncer, sobre todo, cuando se combina con otros tratamientos convencionales (21).

El RNA de interferencia pequeño (siRNA) es una molécula de RNA de doble cadena responsable del silenciamiento de una secuencia génica específica. El RNA exógeno introducido en la célula es reconocido por una RNasa y es degradado en fragmentos cortos, de unos 23 pares de bases. Algunas veces estos fragmentos son amplificados debido a la acción de una RNA polimerasa RNA-dependiente y, en ese caso, pueden ser transmitidos a la progenie celular. De esta forma, se puede suprimir experimentalmente la expresión de un gen celular, mediante la introducción en las células de un RNA de doble cadena que se corresponda con la secuencia del gen silenciado (6) (**Figura 4**). Gondi y colaboradores han demostrado la posibilidad de aplicar el RNA de interferencia en la Terapia Génica del cáncer inhibiendo la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* en modelos celulares de glioma humano (22).



Figura 4. Mecanismo de interferencia del RNA (Modificado Ref. 6).

La desventaja de la introducción directa de fragmentos de RNA de doble cadena en una célula es que la expresión génica es sólo temporal. Sin embargo, Brummelkamp y colaboradores han desarrollado un nuevo vector, denominado pSUPER, que dirige la síntesis de siRNAs en las células de mamífero. Estos autores han demostrado que la expresión del siRNA mediada por este vector permite la inactivación del gen diana durante largos periodos de tiempo (23).

Otra posibilidad es la introducción de genes supresores de tumores con efectos inhibidores sobre la angiogénesis en las células tumorales, para frenar la formación de nuevos vasos. El gen de la maspina es un gen supresor de tumores cuya expresión decae durante los procesos de malignización y metástasis (1). En 2005 Watanabe y colaboradores demostraron que la expresión del gen humano de la maspina mediada por virus adenoasociados puede impedir el crecimiento tumoral de modo eficiente, mediante la inhibición de la angiogénesis en el cáncer de próstata (24).

La survivina se ha identificado como un producto génico antiapoptótico sobre-expresado en los vasos sanguíneos en formación en casos de linfoma y otros tipos de cáncer. Xiang y colaboradores han utilizado una "vacuna" de DNA, portadora de un gen mutado de la survivina, para demostrar el efecto antiangiogénico de esta estrategia en el cáncer de pulmón (25).

Las nanopartículas (NPs) —como ya se explicó en el capítulo 3 de este mismo libro— son partículas poliméricas coloidales de tamaño inferior a una micra en las que se encapsula o se adsorbe en su superficie un agente terapéutico de interés. Debido a su pequeño tamaño, las NPs tienen una elevada tasa de captación celular y una alta eficacia debido a su capacidad de proteger al agente terapéutico frente a la degradación causada por las enzimas lisosomales (3). En 2005, Schiffelers y colaboradores prepararon nanopartículas con RNA de interferencia de pequeño tamaño para inhibir la expresión del receptor de VEGF en los nuevos vasos sanguíneos tumorales, demostrando de esta forma que este modo de transferencia génica permite salvar los obstáculos farmacológicos de la administración local de un RNA de interferencia en solución acuosa en la terapia contra el cáncer (26).

En estudios recientes se están utilizando nanopartículas formadas por un núcleo de DNA empaquetado en una envuelta lipídica que también contiene un péptido de octarginina, que favorece la internalización por macropinocitosis (**Figura 5**). La transferencia de un plásmido que contenía el gen de la luciferasa, mediante estas nanopartículas, demostró una eficacia similar a la mediada por vectores adenovirales, pero con una toxicidad asociada mucho menor (27).

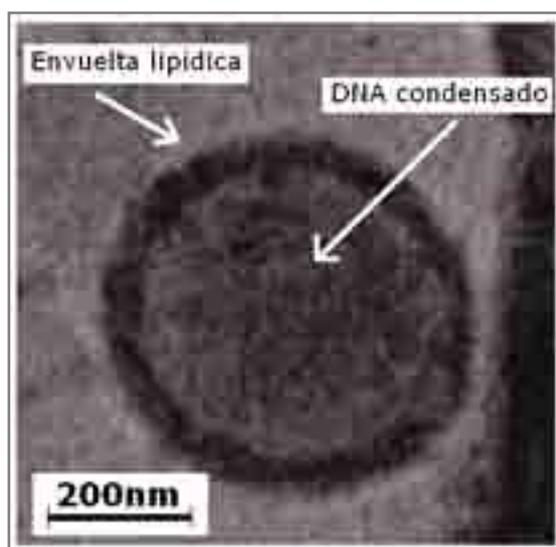


Figura 5. Microfotografía electrónica de una nanopartícula (Modificado Ref. 27).

La carga positiva de los liposomas catiónicos —vesículas esféricas microscópicas de fosfolípidos y colesterol— aumenta notablemente su incorporación en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales, por lo que este mecanismo de transferencia puede ser muy adecuado para el transporte de fármacos cuya diana son los tumores. Por ejemplo, se ha logrado inhibir con éxito la angiogénesis utilizando los genes de la angiostatina y endostatina transferidos mediante liposomas catiónicos (1,3).

El grupo de Logg, en Los Angeles, ha desarrollado un retrovirus competente en replicación (RCR) derivado del virus de la leucemia murina, capaz de replicarse y transferir un transgén tanto en cultivo como en modelos *in vivo* de tumores sólidos (28). Aprovechando las ventajas de los vectores RCR, Sun y colaboradores introdujeron el gen de la proteína inducible por interferón-10 (IP-10) mediante vectores RCR en células tumorales de ratón tanto *in vivo* como *in vitro*, logrando una producción constante de la proteína en cultivo y la reducción de la angiogénesis (29).

Los vectores más utilizados en la actualidad son los adenovirus recombinantes, que presentan las ventajas de una elevada eficacia de transferencia tanto en células en división como en quiescencia, una gran capacidad de multiplicación y de empaquetamiento de genes exógenos y una gran facilidad para ser purificados. Por otra parte, no son oncogénicos y

permiten una elevada expresión de los transgenes (1). En los últimos años se han llevado a cabo ensayos clínicos de Fase I en pacientes con cáncer de ovario, utilizando vectores adenovirales que portan el gen p53 (Ad-p53) (30). En China también se han desarrollado numerosos ensayos de Fase I y II utilizando Ad-p53 recombinante para tratar cáncer laríngeo (Fase I), carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello (Fase II) y carcinoma nasofaríngeo (Fase II) (31-33).

Los adenovirus oncolíticos son un tipo especial de adenovirus diseñados para que presenten una capacidad lítica de las células en las que se replican. Este sistema es muy eficaz y permite la infección exclusiva de células tumorales. Con ello se consigue una amplificación del efecto del gen terapéutico mediante la expansión de la progenie del vector (1).

Los virus adenoasociados recombinantes tienen la ventaja de presentar un amplio rango de células diana para ser infectadas, una escasa respuesta inmune y una expresión génica mantenida (1). Respecto a la Terapia Génica antiangiogénica contra el cáncer utilizando este tipo de vectores, existen varios ejemplos de investigaciones recientes centradas en el tratamiento del cáncer de colon (*in vivo* e *in vitro*), cáncer ovárico (*in vivo*) y glioblastoma humano (*in vivo*) (34-36).

En los últimos años se ha prestado atención a la posibilidad de combinar el tratamiento antiangiogénico con quimioterapia y radioterapia. La utilización de estas estrategias simultáneamente parece que podría suprimir eficazmente la angiogénesis y el crecimiento tumoral en modelos de cáncer de próstata. También un ensayo clínico de Fase III, realizado en China, utilizando endostatina recombinante al mismo tiempo que la quimioterapia en cáncer de pulmón de células no escamosas, ha dado como resultado un aumento significativo en las tasas de respuesta terapéutica (1).

En la actualidad se están reclutando pacientes para un ensayo clínico de Fase I que comenzó en diciembre de 2006, promovido por el Baylor College of Medicine, y que aplica la Terapia Génica *in situ* mediada por vectores adenovirales con RTVP-1 en cáncer de próstata antes de la prostatectomía radical (37). Estudios previos han confirmado en modelos murinos el efecto antiangiogénico y antitumoral de este gen, demostrando que una sola inyección intratumoral del vector adenoviral, construido con este gen, permite reducir considerablemente el tamaño del tumor, las metástasis a pulmón y la densidad de neovasos sanguíneos locales (38).

La Universidad de Pensilvania, en colaboración con Biogen Idec, comenzó en marzo de 2006 el reclutamiento de pacientes para un ensayo clínico de Fase I consistente en la aplicación de un protocolo de Terapia Génica mediada por vectores adenovirales recombinantes (Ad-hIFN- β), no replicativos, que contienen el gen del interferón- β humano. Este estudio se diseñó para evaluar la seguridad y la dosis máxima tolerada en dos administraciones intrapleurales de Ad-hIFN- β en pacientes con mesoteliomas pleurales malignos, con y sin metástasis (39).

Más recientemente, el National Cancer Institute (NCI) de EEUU, a través del Mount Sinai School of Medicine, ha iniciado el reclutamiento de pacientes, en enero de 2007, para un ensayo clínico de Fase I, cuyo objetivo es la inyección intratumoral de un vector adenoviral que contiene el cDNA del gen de la interleuquina-12 humana (Ad-hIL12), en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepática. El propósito de este estudio es determinar los efectos secundarios, así como la dosis máxima tolerada del vector, y evaluar la respuesta tumoral e inmune desencadenada por esta estrategia terapéutica (40).

Referencias

1. Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MCM (2006) Cancer gene therapy targeting angiogenesis: An updated review. *World J Gastroenterol*, 12: 6941-8.

2. The Angiogenesis Foundation. Understanding Angiogenesis. Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.angio.org/understanding/understanding.html>.
3. Tandle A, Blazer DG, Libutti SK (2004) Antiangiogenic gene therapy of cancer: Recent developments. *J Transl Med*, 2: 22.
4. Madeddu P (2005) Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol*, 90: 315-26.
5. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-6.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Biología Molecular de la Célula*. 4ª ed. Ed. Omega. Barcelona (Spain).
7. Hernández-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2006) Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol*, 12: 6085-97.
8. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL (2002) Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 105: 1291-7.
9. Safety Study of MultiGeneAngio in Patients With Peripheral Arterial Disease (PAD). Information on Clinical Trials and Human Research Studies. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00390767?order=5>.
10. Stem Cell Mobilization and VEGF Gene Transfer for Heart Failure. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00279539?order=2>.
11. Tanaka T, Manome Y, Wen P, Kufe DW, Fine HA (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med*, 3: 437-42.
12. Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH (2003) Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res*, 63: 386-93.
13. Imagawa Y, Satake K, Kato Y, Tahara H, Tsukuda M (2004) Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin 12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. *Auris Nasus Larynx* 31: 239-45.
14. Fu P, Chen J, Tian Y, Watkins T, Cui X, Zhao B (2005) Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor. *Cancer Gene Ther*, 12: 268-75.
15. Nishikawa T, Ramesh R, Munshi A, Chada S, Meyn RE (2004) Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation. *Mol Ther*, 9: 818-28.
16. Szary J, Szala S (2001) Intra-tumoral administration of naked plasmid DNA encoding mouse endostatin inhibits renal carcinoma growth. *Int J Cancer* 91: 835-9.
17. Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, Singhal A, Sullivan S, Rolland A, Ralston R, Min W (1999) Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol*, 17: 343-8.
18. Barron LG, Uyechi LS, Szoka FC (1999) Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther*, 6: 1179-83.
19. Uesato M, Gunji Y, Tomonaga T, Miyazaki S, Shiratori T, Matsubara H, Kouzu T, Shimada H, Nomura F, Ochiai T (2004) Synergistic antitumor effect of antiangiogenic factor genes on colon 26 produced by low-voltage electroporation. *Cancer Gene Ther*, 11: 625-32.
20. Phillips MI (2000) Somatic gene therapy for hypertension. *Braz J Med Biol Res*, 33: 715-21.
21. Wang Y, Wang R, Qiao H, Li JY, Peng TS, Li Y, Zhang M, Liang HZ, Qiu JS (2005) Targeted inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human osteosarcoma cell line by antisense VEGF165 cDNA promoted by hypoxia reaction element. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 34: 588-91.
22. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS (2004) RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene* 23: 8486-96.
23. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-3.
24. Watanabe M, Nasu Y, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nagai A, Sasano T, Shimada T, Daida H, Kumon H (2005) Adeno-associated virus 2-mediated intratumoral prostate cancer gene therapy: Long-term maspin expression efficiently suppresses tumor growth. *Hum Gene Ther*, 16: 699-710.
25. Xiang R, Mizutani N, Luo Y, Chiodoni C, Zhou H, Mizutani M, Ba Y, Becker JC, Reisfeld RA (2005) A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res*, 65: 553-61.
26. Schifflers RM, Ansari A, Wu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC (2004) Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 32: e149.
27. Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Hama S, Akita H, Ueno M, Kishida H, Kudoh M, Mishina Y, Kataoka K, Yamada M, Harashima H (2007) Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Ther*, 14: 682-9.
28. Logg CR, Tai CK, Logg A, Anderson WT, Kasahara N (2001) A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery *in vitro* and in solid tumors. *Hum Gene Ther*, 12: 921-32.
29. Sun Y, Finger C, Alvarez-Vallina L, Cichutek K, Buchholz CJ (2005) Chronic gene delivery of interferon-inducible protein 10 through replication-competent retrovirus vectors suppresses tumor growth. *Cancer Gene Ther*, 12: 900-12.
30. Wolf JK, Bodurka DC, Gano JB, Deavers M, Ramondetta L, Ramirez PT, Levenback C, Gershenson DM (2004) A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 94: 442-8.
31. Han DM, Huang ZG, Zhang W, Yu ZK, Wang Q, Ni X, Chen XH, Pan JH, Wang H (2003) Effectiveness of recombinant adenovirus p53 injection on laryngeal cancer: Phase I clinical trial and follow up. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83: 2029-32.

32. Zhang SW, Xiao SW, Liu CQ, Sun Y, Su X, Li DM, Xu G, Cai Y, Zhu GY, Xu B, Lü YY (2003) Treatment of head and neck squamous cell carcinoma by recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy: A phase II clinical trial of 42 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83: 2023-8.
33. Chen CB, Pan JJ, Xu LY (2003) Recombinant adenovirus p53 agent injection combined with radiotherapy in treatment of nasopharyngeal carcinoma: A phase II clinical trial. *Zhonghua Yixue Zazhi* 83: 2033-5.
34. Tu SP, Cui JT, Liston P, Huajiang X, Xu R, Lin MC, Zhu YB, Zou B, Ng SS, Jiang SH, Xia HH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC (2005) Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* 128: 361-75.
35. Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S (2005) Recombinant adenoassociated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 1342-7.
36. Yanamandra N, Kondraganti S, Gondi CS, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS (2005) Recombinant adeno-associated virus (rAAV) expressing TFPI-2 inhibits invasion, angiogenesis and tumor growth in a human glioblastoma cell line. *Int J Cancer* 115: 998-1005.
37. Phase I Pre-Radical Prostatectomy RTVP-1 Gene Therapy for Prostate Cancer. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00403221?order=1>.
38. Satoh T, Timme TL, Saika T, Ebara S, Yang G, Wang J, Ren C, Kusaka N, Mouraviev V, Thompson TC (2003) Adenoviral vector-mediated mRTVP-1 gene therapy for prostate cancer. *Hum Gene Ther*, 14: 91-101.
39. Gene Therapy for Pleural Malignancies. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00299962?order=6>.
40. Interleukin-12 Gene in Treating Patients With Liver Metastases Secondary to Colorectal Cancer. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00072098?order=4>.

CAPÍTULO 14

Medicina Genómica y Terapia Génica en las enfermedades neurodegenerativas

Ramón Cacabelos y Antonio Liras

El Proyecto Genoma Humano (PGH) representa uno de los acontecimientos científicos más relevantes de la historia reciente —comparable al progreso sociocultural del Renacimiento y la época de la Ilustración— que viene a culminar los primeros pasos sobre el entendimiento de la genética, tras el establecimiento de las Leyes de Mendel en la segunda mitad del siglo XIX. Con el PGH se ha podido acelerar el ritmo del conocimiento científico en biociencias, en biotecnología y en medicina.

La genética y la genómica persiguen explicar dónde están ubicados los genes en cada uno de los cromosomas que integran el cariotipo masculino (46XY) y el femenino (46XX); cómo se organizan los genes dentro de la estructura del genoma (genómica estructural); cómo se relacionan entre sí; cómo dan lugar a la síntesis de proteínas (genómica funcional); cómo coordinan el desarrollo tisular; cómo dirigen el metabolismo celular; cómo planifican la diferenciación celular; cómo originan la biodiversidad y cuáles son las condiciones de normalidad genética o las condiciones de disfuncionalidad que causan enfermedades o provocan la muerte.

El PGH, a lo largo de sus 15 años de vida, nos ha aportado datos sustanciales y sorprendentes, especialmente en lo que se refiere al conocimiento de la genómica estructural. El primer borrador de la estructura del genoma humano apareció en febrero de 2001, presentado por el International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC) junto con Celera Genomics. En el año 2004 el IHGSC —formado por 20 instituciones de diferentes países— presentó el resultado final de la secuenciación. La secuencia incompleta (90%) de 2001 indicaba que el tamaño global del genoma humano era de 3,2 Gb (giga bases), de las cuales 2,95 eran eucromáticas, y que sólo un 1,1-1,4% de la secuencia global del genoma codificaba proteínas (26000-31000 genes); es decir, sólo un 5% del 28% de la secuencia de DNA se transcribía en RNA. Más de la mitad del DNA genómico consistía en secuencias repetidas de características variables: un 45% estaba representado por cuatro clases de elementos de DNA parasitario; un 3% eran repeticiones de unas pocas bases sin sentido aparente y un 5% eran duplicaciones recientes de largos segmentos de DNA. La secuencia preliminar del genoma humano reflejaba una complejidad proteómica superior a la de los invertebrados; cientos de genes humanos parecían resultar de la transferencia horizontal de bacterias en determinados puntos evolutivos del linaje humano; aproximadamente, la mitad de los genes humanos eran el resultado de la inserción de elementos transponibles, con miles de transposones y retrotransposones inactivos; las regiones pericentroméricas y subteloméricas de los cromosomas aparecían plagadas de duplicaciones segmentarias de otros fragmentos distribuidos en diferentes puntos del genoma, en cantidades muy superiores a las observadas en otras especies; la presencia de elementos *Alu* en regiones ricas en GC se manifestaban como posibles factores evolutivos favorables; la tasa de mutaciones era dos veces más frecuente en la meiosis masculina que en la femenina; las regiones pobres en CG se correspondían con las bandas G oscuras de los cromosomas cariotipados; la tasa de recombinación genética era más alta en regiones distales y en los brazos p (cortos) de los cromosomas, siguiendo un patrón de, al menos, un entrecruzamiento por brazo cromosómico en cada meiosis, y, por último, que el genoma humano aparecía poblado por más de 1,4 millones de variantes polimórficas o "*single nucleotide polymorphisms*" (SNPs), posiblemente responsables de la biodiversidad humana y de muchas enfermedades poblacionales.

La secuencia definitiva de 2004 ofrecida por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (IHGSC) (1) confirmaba gran parte de estos hallazgos, con una gran

precisión y con una tasa de error inferior a un evento por cada 100000 bases. Desde entonces ha quedado establecido que el genoma eucromático humano de 2,88 Gb (tamaño total=3,08 Gb) está integrado por $2,8 \times 10^9$ nucleótidos que dan lugar a un catálogo genético de 22287 loci genéticos, con un total de 34214 transcritos, correspondientes a 1,54 transcritos por locus. Estos loci portan un total de 231667 exones en 34 Mb, que representan el 1,2% del genoma total. Las regiones no transcribibles ocupan unas 21 Mb, equivalente a un 0,7% del genoma eucromático. En definitiva, la estimación más actual sugiere que el número total de genes codificantes del genoma humano está en torno a los 20.000-25.000. Las múltiples duplicaciones que inundan el genoma llaman poderosamente la atención porque su estructura inusual las hace vulnerables a deleciones y reorganizaciones genómicas con importantes consecuencias fenotípicas.

La cartografía de estos genes y su ubicación física en el genoma será la base para una búsqueda intensa de funciones (genómica funcional), lo cual nos permitirá saber quienes somos (genómica comparada), de donde venimos (genómica evolutiva), a dónde vamos (genómica predictiva), cómo enfermamos (patogenómica) y cómo podremos protegernos para combatir nuestras debilidades genómicas. Este es el argumento que utilizará la Medicina Genómica para abordar una profunda transformación de la labor médica, para pasar del empirismo y del ensayo y el error a un planteamiento mucho más científico y eficaz en el ámbito de las ciencias médicas.

En las células eucariotas, además del genoma nuclear, del que se ocupa la genómica clásica, existe el genoma mitocondrial (DNAm_t), que fue el resultado de la simbiosis ancestral de una bacteria (que aportara el aparato energético) con una célula eucariota primitiva (que aportara el entorno metabólico adecuado a la bacteria simbiote). El estudio del DNAm_t, que es aportado exclusivamente por las madres en el óvulo fecundado, nos ha permitido seguir el rastro de la "Eva Primitiva" y trazar la ruta evolutiva del Homo sapiens, desde su aparición en África. Así mismo, mutaciones en el DNAm_t causan múltiples enfermedades y son posiblemente responsables de la heterogeneidad genética por heteroplasmia materna.

Medicina Genómica

Uno de los principales problemas de la medicina actual es la carencia de marcadores presintomáticos capaces de detectar el riesgo de padecer una enfermedad muchos años antes de que ésta se manifieste. Lo que precisa la medicina del futuro es disponer de marcadores predictivos que permitan identificar riesgos con antelación para poder implementar programas preventivos eficaces. En fases tempranas de la enfermedad, la medicina convencional caracteriza el proceso patológico subyacente mediante criterios fenotípicos (clínica médica), marcadores bioquímicos (analítica) y, ocasionalmente, marcadores genéticos (genética poblacional, genética mendeliana, SNPs de susceptibilidad). En esta fase sintomática, la Medicina Genómica tiene que aportar marcadores moleculares de certeza, con alta fiabilidad diagnóstica, mediante el análisis genómico y proteómico; ello permitirá crear programas de intervención precoz para el abordaje terapéutico temprano de las enfermedades (**Figura 1**). Finalmente, en las fases tardías de la enfermedad, nuestra medicina clásica suele valerse de tratamientos sintomáticos y paliativos, dejando que la naturaleza haga el resto; en cambio, la Medicina Genómica tiene que ser capaz de diseñar estrategias eficaces para neutralizar el avance de la enfermedad mediante protocolos de Farmacogenética y Farmacogenómica. Por lo tanto, la Medicina Genómica tiene que ayudarnos a entender las causas de las enfermedades desde una perspectiva etiopatogénica molecular (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica); a diferenciar las causas ambientales de las causas genéticas; a anticiparnos a la expresión fenotípica de la enfermedad, y a tratarla con eficacia (Farmacogenética, Farmacogenómica, nutrigenética, nutrigenómica, Terapia Génica) (2,3).

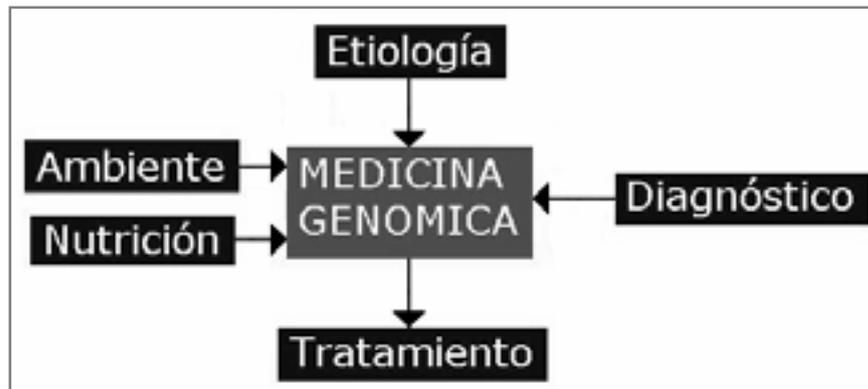


Figura 1. Algoritmo general de la Medicina Genómica basado en factores ambientales, nutricionales y diagnósticos para ofrecer un tratamiento personalizado y más eficaz en relación a una determinada etiología.

El recorrido natural de la Medicina Genómica desde el entendimiento de la etiopatogenia hasta un determinado tratamiento, pasa por conocer los genes individuales que se asocian a la enfermedad, su interrelación con otras redes genómicas responsables de la organización de rutas enzimáticas (metabolómica), y sus diferentes variantes polimórficas que influyen en el metabolismo de los fármacos, tanto desde el punto de vista de la seguridad como de la eficacia (**Figura 2**).

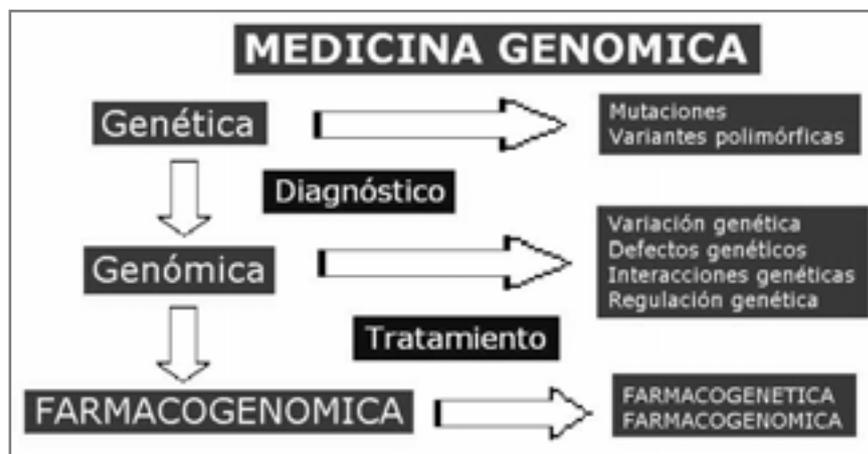


Figura 2. Desde la Genética, mediante el estudio de mutaciones y variantes polimórficas, la Genómica por el estudio de la variación genética, de los defectos genéticos, de la interacción genética y de la regulación, a través de diagnósticos y tratamientos particularizados, se llega a la Farmacogenómica en sus dos vertientes Farmacogenética y Farmacogenómica.

La estructura de nuestro genoma es el resultado de la presión evolutiva, a través de factores positivos y negativos de selección natural. También, por la distribución aleatoria de variantes polimórficas de predisposición o fortaleza; por mutaciones genéticas beneficiosas o perjudiciales y por factores epigenéticos y fenómenos epistáticos. El genoma es una estructura dinámica que está en relación permanente con nuestro perimundo. Del resultado de equilibrio o desequilibrio entre el genoma y el entorno surge el estado de salud o enfermedad, respectivamente. Los factores ambientales que más influyen en ese equilibrio dinámico genoma-entorno son la nutrición, el aire que respiramos, los líquidos que ingerimos y los fármacos que tomamos. Estos factores ambientales tienen que servir como elementos preventivos para evitar enfermedades, y la intervención Farmacogenética y Farmacogenómica tiene que ser el arma del futuro para controlar, prevenir y tratar la enfermedad con criterios de optimización terapéutica individualizada.

En las sociedades en vías de desarrollo predominan las enfermedades vinculadas al ambiente (infecciones, intoxicaciones, desnutrición, etc.). En las sociedades avanzadas predominan las enfermedades degenerativas vinculadas a defectos genómicos heredables.

Desde un punto de vista genético, las enfermedades pueden clasificarse en cromosopatías numéricas o estructurales; enfermedades mendelianas (recesivas, dominantes, ligadas al sexo); enfermedades poligénicas/multifactoriales (complejas), y enfermedades mitocondriales. Como norma general, cuantos más genes están afectados, más precoz es el inicio de la enfermedad, más rápido su curso y menos eficaz es el tratamiento; en cambio, cuantos menos genes están afectados, más tardía es la aparición, más lento es su curso y mejor respuesta presentan al tratamiento. Esto es aplicable a un gran número de enfermedades del adulto y de la vejez (cardiopatías, diabetes, hipertensión, cáncer, demencias, enfermedades mentales, etc.). Muchas de estas dolencias tienen carácter degenerativo porque representan una forma degenerada de funcionamiento metabólico que a lo largo de la vida se manifestó como normal pero que a partir de un cierto momento sufre un proceso de “descarrilamiento” funcional. En esta categoría se enmarca la degeneración neuronal que conduce a una demencia.

El fenómeno del envejecimiento poblacional se ha convertido en un problema socio-sanitario de primera magnitud, especialmente en las sociedades desarrolladas. Junto a la emergencia de necesidades económicas, arquitectónicas y socio-familiares inherentes a este colectivo, en el último siglo la esperanza de vida se duplicó (esperanza media de vida actual masculina: 78-80 años; femenina: 82-84 años) y con ello hizo su aparición una modalidad de enfermedades que anteriormente eran raras o poco frecuentes. El paradigma más representativo es la demencia senil, actualmente la principal causa de muerte y discapacidad en mayores de 65 años. La demencia senil es el prototipo de neurodegeneración cerebral, caracterizada por la muerte prematura de las neuronas. Existen más de 80 formas diferentes de demencia siendo la más importante la enfermedad de Alzheimer (50-60%), seguida de la demencia vascular (40-50%) y la demencia mixta (10-15%) —la más prevalente a partir de los 80 años—. Otras formas de demencia son la demencia fronto-temporal, la enfermedad de Pick, la demencia por cuerpos de Lewy o las enfermedades priónicas. El denominador común de todas las demencias es la acumulación de proteínas anómalas en el cerebro, como consecuencia de mutaciones puntuales en genes específicos por alteraciones en procesos post-traduccionales o por defectos en procesos degradativos o conformacionales (por ejemplo, chaperonas, sistema ubiquitina-proteasoma). Ejemplos de esta acumulación de proteínas anómalas en procesos neurodegenerativos son el beta-amiloide en las placas neuríticas de la enfermedad de Alzheimer; la alfa-sinucleína en los cuerpos de Lewy de la demencia tipo Lewy y en la enfermedad de Parkinson; la huntingtina en la enfermedad de Huntington; la proteína priónica en las enfermedades priónicas (enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Gertsman-Sträussler, insomnio familiar fatal); la frataxina en la ataxia de Friedreich; las ataxinas en las degeneraciones espinocerebelosas; la saccina en la ataxia de Charlevoix-Saguenay, y otros muchos ejemplos más que podrían extraerse de otras múltiples enfermedades neurodegenerativas.

Entre el 60% y el 80% de los genes de nuestro genoma se expresan en cerebro. Los genes que gobiernan el desarrollo, la maduración y la función cerebral se organizan en “clusters” que —desde un punto didáctico— pueden clasificarse en genes estructurales, genes funcionales, ergogenes (desarrollo y maduración neuronal), tanatogenes (apoptosis y muerte neuronal programada), autogenes reguladores, oncogenes, y gerontogenes. Cuando la alteración en estas redes genéticas ocurre antes o durante el desarrollo cerebral se producen agenesias; cuando la alteración ocurre en fase de diferenciación neuronal se produce la teratogénesis; cuando el defecto surge antes de la diferenciación se produce la oncogénesis; cuando la disfunción se manifiesta en fase madurativa emergen los problemas mentales y neuropsiquiátricos; y cuando la disfunción poligénica se expresa en fases post-madurativas entonces se activan los procesos neurodegenerativos que inducen la muerte prematura de las neuronas (**Figura 3**).

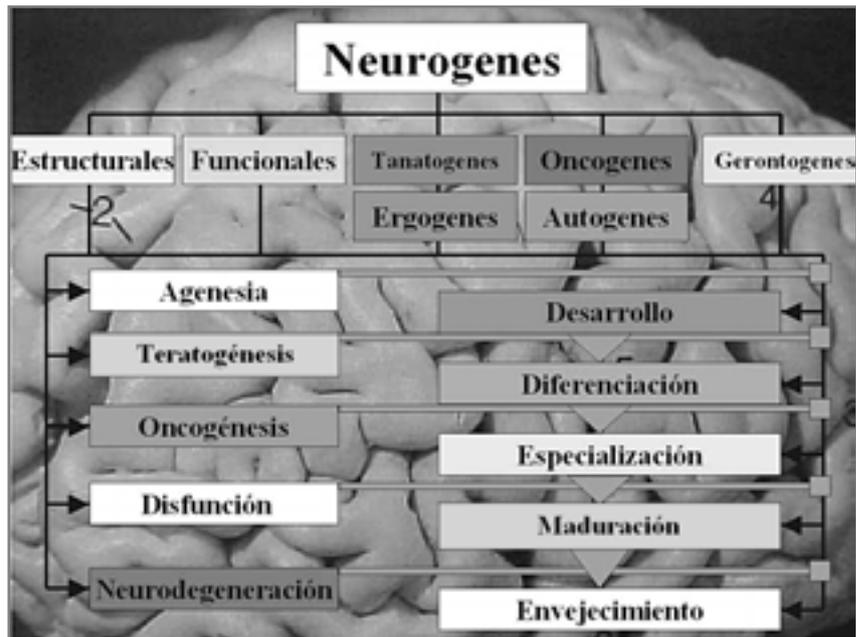


Figura 3. Redes genéticas del cerebro y consecuencias de su disfunción espacio-temporal.

Todas las células de nuestro organismo están programadas para vivir minutos, horas, días, semanas, meses o años, excepto las neuronas, que son el sensor de nuestra longevidad de especie; por ello sobreviven tanto como cada uno de nosotros. En el caso de la demencia degenerativa primaria tipo Alzheimer, las neuronas empiezan a morir en periodos relativamente tempranos de la vida, cuando las neuronas dejan de madurar a los 25-30 años de edad. A partir de entonces se activa una cascada de eventos genéticos y metabólicos que provocan una muerte progresiva de las neuronas, cuya muerte continuada a lo largo de más de 30 años ocasiona una despoblación cerebral que da lugar a la demencia. Después de morir miles de millones de neuronas, tras más de 30-40 años de deceso celular continuo, se manifiestan los síntomas clínicos de la demencia (pérdida de memoria, desorientación témporo-espacial, afasia, apraxia, agnosia, trastorno de conducta, discapacidad funcional). La prevalencia de demencia aumenta del 1% a los 50-60 años, a más del 30% a partir de los 80 años. Hasta el momento actual se han identificado más de 200 genes relacionados con el proceso neurodegenerativo en la enfermedad de Alzheimer.

El gen de la apolipoproteína E (APOE) es un gen pleiotrópico que participa en múltiples procesos metabólicos, como el transporte de lípidos, el metabolismo del colesterol, la madurez cerebral, el procesamiento de grasas en el hígado, etc., y cuyo alelo E4 se asocia a una mayor prevalencia de la enfermedad de Alzheimer. Los tres alelos APOE presentes en la población general son el épsilon (E) 2, 3 y 4, que dan lugar a 6 genotipos APOE: APOE-2/2 (<1%), APOE-2/3 (3-4%), APOE-2/4 (1-2%), APOE-3/3 (50-60%), APOE-3/4 (20-40%) y APOE-4/4 (1-10%). El APOE-4 se acumula en pacientes de Alzheimer y representa el principal factor de riesgo actual de demencia en más del 30-40% de los casos, mientras que el APOE-2 parece ser un factor protector.

Estrategias terapéuticas: Farmacogenética y Farmacogenómica

En los últimos 20 años el tratamiento de la demencia degenerativa se ha abordado mediante cinco medicamentos, cuatro de ellos inhibidores de acetilcolinesterasa (tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina) y un antagonista parcial de receptores NMDA (memantina), todos, en general, de escasa eficacia y pobre relación beneficio-coste. En la actualidad (4,5) se están desarrollando múltiples líneas de intervención terapéutica: 1) Intervención sobre factores genéticos mediante Terapia Génica y silenciamiento genético por RNAi; 2) Terapia anti-amiloidea con inhibidores de beta o gamma-secretasas,

activadores de alfa-secretasa, inhibidores de la agregación y fibrillogénesis amiloide, agentes quelantes de cobre, solubilizadores de beta-amiloide, inhibidores de la formación de APP, y reguladores selectivos de beta-amiloide, así como vacunas anti-amiloide; 3) Intervención anti-tauopática con activadores de fosfatasa, inhibidores de GSK-3, inhibidores de Cdk5, inhibidores de p38 e inhibidores JNK que disminuyen o derogan la hiperfosforilación de las proteínas *tau* que conforman los ovillos neurofibrilares y desestructuran el citoesqueleto neuronal; 4) Inhibidores selectivos de caspasas para evitar la apoptosis neuronal; 5) Terapia con células madre, activadores de la neuritogénesis y de la sinaptogénesis, inhibidores NOGO e inhibidores MOP para prevenir o evitar la muerte neuronal; 6) Regulación de procesos neuroinflamatorios con inhibidores de la COX-1 y la COX-2, agonistas PPARA y PPARG, antiinflamatorios no esteroideos noveles, e inhibidores citoquinicos; 7) Agentes antioxidantes naturales y sintéticos; 8) Inhibidores de reacciones excitotóxicas, como antagonistas NMDA, ampakinas y moduladores de transportadores glutamatérgicos; 9) Agentes bloqueantes de los canales de calcio; 10) Reguladores de disfunción lipídica, como las estatinas, los agonistas PPARG y las lipoproteínas; y, 11) Agentes vasoactivos para regular la función cerebrovascular, como son los inhibidores de la acción del óxido nítrico, los inhibidores HIF o los agonistas de receptores hepáticos.

La gran contribución de la Medicina Genómica a la terapéutica del Alzheimer es la implantación de protocolos básicos y clínicos para el desarrollo de estrategias farmacogenéticas y farmacogenómicas (6-9) (**Figura 4**). El 65-90% de la eficacia y seguridad de un fármaco depende de factores genéticos. Aunque ambos términos pueden intercambiarse, por razones didácticas entendemos por Farmacogenómica el estudio de los factores que determinan la eficacia de un fármaco en relación a su efecto regulador de la expresión de genes causales o relacionados con la patogenia de una enfermedad, mientras que por Farmacogenética entendemos el estudio de los factores que determinan la seguridad de un fármaco en términos de su metabolismo hepático asociado a un conjunto de genes responsables de su biotransformación y farmacocinética. Por lo tanto, de acuerdo a esta definición, la Farmacogenómica se ocuparía más de aquellos factores genéticos relacionados con la eficacia de un medicamento, y la Farmacogenética trataría de los genes responsables de su seguridad farmacológica. En la práctica es imposible desvincular ambos conceptos.

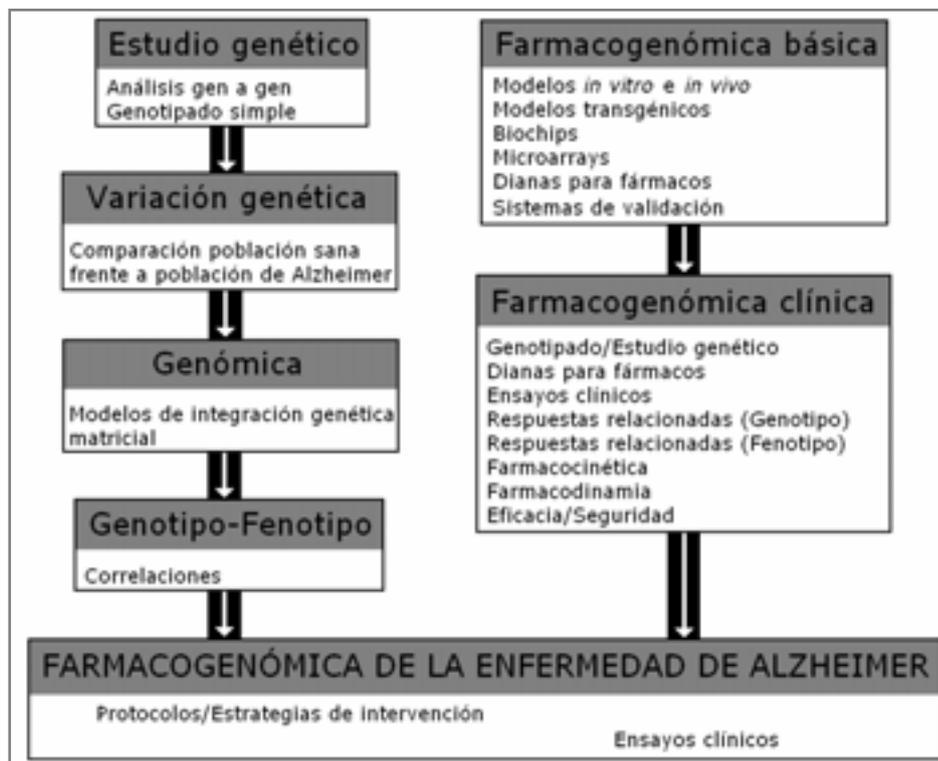


Figura 4. Farmacogenómica básica y clínica en la enfermedad de Alzheimer.

Asumiendo que existen en nuestro genoma unos 1500 genes relacionados específicamente con el metabolismo de fármacos y unos 3000-5000 genes asociados a enfermedades concretas, podría decirse que la red genética que resultara de la integración funcional de todos estos genes podría discriminar entre 4,5 y 7,5 millones de agentes xenobióticos que interaccionaran con un organismo humano.

Desde un punto de vista práctico, cualquier persona es consciente de que un medicamento funciona mejor en unos pacientes que en otros. La razón fundamental de esta variabilidad en la eficacia de un fármaco es de origen genético en más del 50% de los casos. En la enfermedad de Alzheimer, no más de un 10-20% de los pacientes responden con moderada eficacia a los fármacos disponibles. Las causas de este fracaso terapéutico son múltiples: efectos secundarios, intolerancia, el no cumplimiento, factores metabólicos y farmacocinéticos, trastornos nutricionales y factores genéticos. Por ejemplo, todos los pacientes portadores del genotipo APOE-4/4 son "malos" respondedores a cualquier tipo de tratamiento anti-Alzheimer de los actualmente en uso. El gran reto de la Medicina Genómica, además del diseño de nuevos fármacos adaptados a las necesidades del genoma enfermo para regular la expresión de genes anómalos mediante estrategias farmacogenómicas, es estandarizar los protocolos farmacogenéticos para dar el fármaco más adecuado a un paciente concreto, en la dosis óptima y de forma individualizada (10-13). Este es el patrimonio de la Farmacogenética. En este campo destacan los genes de la familia CYP (citocromo P450), integrada por más de 200 genes que se encuentran tanto en vertebrados como en invertebrados.

Terapia génica para las enfermedades neurodegenerativas: El cerebro como objetivo

El uso de la Terapia Génica para corregir o reemplazar genes relacionados con el sistema nervioso es un reto que puede ser alcanzable a largo plazo (14).

Los protocolos en este sentido, se orientan en base a dos objetivos concretos y la vez muy complejos: uno hacia las patologías monogénicas como son las alteraciones del almacenamiento lisosomal, y otro hacia las enfermedades más complejas desde un punto de vista genético como son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

A nadie escapa que el adentrarse en el sistema nervioso es harto complicado, así que en Terapia Génica, para lograr la introducción de un gen, los retos son todavía mayores. Se debe acumular, para lograr el éxito, una inmensa cantidad de conocimientos interrelacionados, entre funciones y expresión de genes lo que servirá para el diseño muy específico de vectores para la liberación de los genes en zonas concretas del cerebro.

Aunque, siendo honestos, estamos todavía en los albores, podemos decir que se han planteado ya muy buenas ideas para comenzar. Una de ellas es sin lugar a dudas el silenciamiento de genes utilizando los llamados RNA silentes o de interferencia (iRNA) —tema que se trata en otro capítulo de este libro—. Aunque son muchos los trabajos al respecto, son los trabajos de Farah y colaboradores (15) los que llegan más lejos en la aplicación de esta estrategia para las enfermedades neurodegenerativas. Especialmente, es interesante este abordaje, mediante la expresión de shRNAs, en aquellas patologías de carácter autosómico dominante como son por ejemplo la ataxia espinocerebelar, la esclerosis amiotrófica lateral, la enfermedad de Huntington o la amiloidosis. Los abordajes en este sentido se basan en la utilización de vectores no virales

Enfermedad de Wilson

La enfermedad de Wilson es una rara enfermedad de final fatal, hereditaria de carácter autosómico recesivo, con una incidencia aproximada de 1/30000. Se caracteriza por la acumulación de cobre en los tejidos, especialmente en hígado, sistema nervioso y globo ocular. Esto se traduce en hepatitis e incluso cirrosis, síntomas neurológicos, como la pérdida de memoria, la dificultad de coordinación o temblores, y cataratas. Afecta por igual a hombres y mujeres de cualquier raza.

La causa es una mutación en el gen ATP7B —situado en el brazo largo del cromosoma 13— que codifica un transportador de cobre que transfiere el metal desde los hepatocitos hasta la bilis. El tratamiento actual no es efectivo y el trasplante de hígado puede ser la solución tan solo paliativa de los síntomas que más comprometen la vida del paciente.

Por esta razón, la Terapia Génica sería una buena alternativa para este tipo de pacientes. Así, en modelos de enfermedad de Wilson en rata (16) se ha expresado el gen defectuoso mediante vectores adenovirales y lentivirales. Los resultados demuestran la reversión de los síntomas aunque de manera transitoria.

Esclerosis lateral amiotrófica

Se trata de una patología que afecta a neuronas motoras de forma devastadora y que hoy por hoy no se conoce su patogenia aunque se apunta que la excitotoxicidad y el estrés oxidativo podrían ser factores desencadenantes (17). Sus síntomas son disfagia, disartria, distrés respiratorio, dolor y desórdenes psicológicos. El futuro para la Esclerosis lateral amiotrófica, en particular, como lo será para las enfermedades neurodegenerativas, en general, se basará en la combinación de la Terapia Génica y la Terapia Celular, utilizando células madre (18).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un desorden crónico y progresivo cuyo tratamiento actual tan solo retarda la aparición de los síntomas graves de la enfermedad que se relacionan con una alteración severa de la coordinación neuro-motora. La Terapia Génica podría ser —¿por qué no?— una alternativa para esta grave enfermedad neurodegenerativa (19). Hasta ahora en modelos animales de esta enfermedad los mejores resultados se han obtenido mediante estrategias *in vivo* y utilizando vectores virales, fundamentalmente, los vectores adenoasociados por ser los más seguros y eficaces.

Así, se ha demostrado (20) que la inyección estereotáxica de vectores en cerebros de primates consigue una expresión continua y selectiva de proteínas en zonas muy concretas del cerebro sin una toxicidad apreciable.

Es sabido que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson conduce a cambios en el circuito de los ganglios basales como es la disminución inhibitoria dependiente de GABA hacia el núcleo subtalámico. El GABA o ácido gamma-aminobutírico, que deriva del ácido glutámico mediante descarboxilación catalizada por la glutamato-decarboxilasa (GAD), es el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral.

En base a esta premisa, Kaplitt y colaboradores (21), han evaluado la seguridad, tolerancia y eficacia de la transferencia, mediante vectores adenoasociados (AAV), del gen de la enzima glutamato-decarboxilasa (GAD) en el núcleo subtalámico de pacientes con la enfermedad de Parkinson. En este ensayo no se observan efectos adversos relacionados con el protocolo de Terapia Génica utilizado y, además, los parámetros que evalúan el grado de la enfermedad de Parkinson como el UPDRS ("*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*"), el ADL ("*Scales of activities of daily living*"), las pruebas neuro-psicológicas y el PET ("*Imaging with 18-fluorodeoxyglucose*"), demuestran ya una clara mejoría de los pacientes durante los noventa primeros días después de la transferencia génica manteniéndose más allá de los 12 meses. En concreto, los datos de PET revelaron una reducción sustancial del metabolismo

talámico restringido al hemisferio tratado con una clara correlación entre la clínica de las capacidades motoras y el metabolismo cerebral en la zona suplementaria del área motora. El hallazgo más importante de estos estudios es que se logra la transferencia de un gen en una zona muy concreta del cerebro, algo que hasta ahora era impensable y no se había logrado todavía. A pesar de ello se trata también, aunque de forma más sofisticada y arriesgada, de un tratamiento paliativo de los síntomas pero en ningún caso —y este el gran reto todavía pendiente— capaz de evitar la apoptosis y muerte neuronal que es el hecho fundamental que agrava el progreso de la enfermedad y la hace irreversiblemente fatal.

Sobre la base de estos estudios, hay en curso tres ensayos clínicos de Fase I utilizando también AAV que portan el gen de la enzima L-amino ácido aromático descarboxilasa. Uno de ellos (22) está promovido por *Genzyme*. El estudio comenzó en febrero de 2007 y todavía se está llevando a cabo el reclutamiento de los pacientes, todos ellos con la enfermedad de Parkinson. El título del proyecto es: "*A Phase I open label safety study of intrastriatal infusion of adeno-associated virus encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase (AAV-hAADC-2) in subjects with Parkinson's disease*". El propósito fundamental de este ensayo es estudiar la seguridad de los vectores de transferencia, en cuanto a los efectos adversos relacionados con la inmunogenicidad y las reacciones anafilácticas o de inflamación.

Aunque el papel que desempeña el sistema enzimático de la L-amino ácido aromático descarboxilasa ya se ha comentado anteriormente las premisas fundamentales para iniciar este ensayo clínico se muestran en cuadro siguiente:

- En un paciente con la enfermedad de Parkinson el cuerpo calloso pierde progresivamente su capacidad para enviar señales de dopamina al cuerpo estriado.
- Para compensar la disminución de dopamina en el cuerpo estriado, se administra L-dopa a los pacientes, droga que se convierte en dopamina a través de la amino ácido aromático descarboxilasa (AADC).
- Con el tiempo el cerebro pierde su capacidad remanente de convertir la L-dopa en dopamina haciéndose progresivamente y del todo ineficaz el fármaco.
- En el protocolo de Terapia Génica que se pretende utilizar mediante la inserción del gen de la AADC, se utiliza un vector viral adenoasociado no patógeno al cual más del 90% de los individuos han sido expuestos de forma natural en su vida, por lo que no cabe esperar reacciones inmunogénicas.
- El vector es tejido específico —neurotrópico— y se dirige fundamentalmente a neuronas.
- La construcción génica formada por el vector (AAV) y el gen terapéutico (hAADC-2), se inyecta en el núcleo estriado mediante un procedimiento quirúrgico que no está, evidentemente, exento de riesgo.
- La administración de L-dopa se continua de forma simultánea tras la inyección del vector.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, que se manifiesta por un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, en correlación directa con la muerte neuronal de diferentes zonas del cerebro. La enfermedad suele tener una duración media de 10 a 12 años.

Los estudios de Terapia Génica para esta patología se han centrado obviamente en activar el crecimiento neuronal mediante el aporte de factores de crecimiento nervioso que estimulan la función colinérgica y previenen la muerte neuronal. Así, Braddock (23) ha estudiado la liberación de factor de crecimiento anabólico en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer en grado moderado, utilizando fibroblastos autólogos modificados *ex vivo* para producir factor de crecimiento nervioso (NGF). En este sentido, estudios en ensayo clínico de Fase I están demostrando una muy buena tolerancia y un mantenimiento sostenido del declive cognoscitivo de los pacientes en correlación con el incremento en la actividad metabólica de la corteza cerebral.

En esta misma dirección se está investigando la activación de rutas anti-apoptóticas y la inhibición de las vías pro-apoptóticas, así como la funcionalidad de determinados mecanismos celulares que están implicados directa o indirectamente en estas vías, como es el caso del sistema ERK/MAPK ("*extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*") o el sistema CREB ("*cAMP response element-binding*") (24).

Terapia Génica y Terapia Celular aplicadas a la enfermedad de Parkinson y Alzheimer

Sin lugar a dudas la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer son las enfermedades neurodegenerativas más comunes. No es de extrañar, por ello, que sean el objetivo principal tanto de la Terapia Génica como de la Terapia Celular.

Dado además que la edad es un factor condicionante fundamental para el desencadenamiento y progresión de estas dos enfermedades, es fácil imaginar que el número de pacientes —vista la mayor expectativa de vida actual— se incremente dramáticamente en los próximos años. Por otro lado, las terapias actuales son claramente insuficientes y en el mejor de los casos tan solo paliativas. Por esta razón es muy importante y prioritario aprovechar el avance en los conocimientos moleculares relacionados con la etiopatogenia de estas y otras muchas enfermedades humanas. El direccionamiento sobre la causa íntima, que evidentemente reside en los componentes de la maquinaria molecular de las neuronas, es el objetivo que persigue la Terapia Génica y la Medicina Regenerativa a través de la Terapia Celular (25). El futuro está, sin lugar a dudas, en la utilización de células madre adultas o embrionarias que puedan servir de vehículos de genes y/o moléculas correctoras de un defecto molecular.

Respecto a la Farmacogenómica, en general, los retos para su aplicación en la medicina clínica práctica están planteados y muchos de ellos ya están en marcha (26).

Referencias

1. Human Genome Sequence Quality Standards. National Human Genome Research Institute [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.genome.gov/10000923>.
2. Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM (2003) Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*, 4: 937-47.
3. Meyer UA (2004) Pharmacogenetics: Five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*, 5: 669-76.
4. Cacabelos R, Fernández-Novoa L, Corzo L, Pichel V, Lombardi V, Kubota Y (2004) Genomics and phenotypic profiles in dementia: Implications for pharmacological treatment. *Meth Find Exper Clin Pharmacol*, 26: 421-44.
5. Cacabelos R (2002) Pharmacogenomics for the treatment of dementia. *Ann Med*, 34: 357-79.
6. Cacabelos R (2004) Genomic characterization of Alzheimer's disease and genotype-related phenotypic analysis of biological markers in dementia. *Pharmacogenomics* 5: 1049-105.
7. Cacabelos R (2005) Pharmacogenomics and therapeutic prospects in Alzheimer's disease. *Exp Opin Pharmacother*, 6: 1967-87.
8. Cacabelos R (2005) Pharmacogenomics, nutrigenomics and therapeutic optimization in Alzheimer's disease. *Aging Health* 1: 303-48.
9. Cacabelos R (2005) Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging. *In: Genomic Medicine Series (Parte 1) Meth Find Exper Clin Pharmacol* 27(Suppl.A): 1-573.
10. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM (2001) Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharm Toxicol*, 41: 815-50.
11. Roses AD (2004) Pharmacogenetics and drug development: The path to safer and more effective drugs. *Nat Rev Genet*, 5: 645-56.
12. Evans WE, McLeod HL (2003) Pharmacogenomics-Drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 348: 538-49.
13. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, 57: 119-37.
14. Cardone M (2007) Prospects for gene therapy in inherited neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*, 20: 151-8.
15. Farah MH (2007) RNAi silencing in mouse models of neurodegenerative diseases. *Curr Drug Deliv*, 4: 161-7.
16. Merle U, Stremmel W, Encke J (2007) Perspectives for gene therapy of Wilson disease. *Curr Gene Ther*, 7: 217-20.
17. Mitchell JD, Borasio GD (2007) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 369: 2031-41.
18. Regeneración de Tejidos. Monografía en formato electrónico. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.intramed.net/actualidad/not_1.asp?idNoticia=29133.
19. Gómez M, Fernández A (2007) Gene therapy for Parkinson's disease. *Neurología* 22: 27-38.

20. Muramatsu S (2007) Gene therapy for Parkinson's disease. *Brain Nerve* 59: 425-30.
21. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, Doring MJ (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: An open label, phase I trial. *Lancet* 369: 2097-105.
22. Base de datos pública sobre ensayos clínicos del Instituto Nacional de la Salud de EEUU [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00229736?order=1>
23. Braddock M (2005) Safely slowing down the decline in Alzheimer's disease: Gene therapy shows potential. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 913-5.
24. Tuszynski MH (2007) Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 21: 179-89.
25. Korecka JA, Verhaagen J, Hol EM (2007) Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Regen Med*, 2: 425-46.
26. Swen JJ, Huizinga TW, Gelderblom H, de Vries EGE, Assendelft WJJ, Kirchheiner J, Guchelaar HJ (2007) Translating Pharmacogenomics: Challenges on the Road to the Clinic. *PLoS Med*, 4(e209): 1-8. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://medicine.plosjournals.org/archive/15491676/4/8/pdf/10.1371_journal.pmed.0040209-S.pdf

CAPÍTULO 15

Normativa sobre ensayos clínicos con medicamentos de Terapia Génica

María Antonia Serrano

La Terapia Génica supone una estrategia novedosa e interesante de tratamiento que plantea interrogantes específicos que deben ser abordados a lo largo de su investigación. En efecto, los medicamentos de Terapia Génica se definen entre las terapias avanzadas en el Artículo 47 de la Ley 29/2006 (1) que constituye la norma básica que regula la autorización de medicamentos. Por ello, en base a su consideración de medicamento, los ensayos clínicos de Terapia Génica deben seguir la normativa general sobre ensayos clínicos con medicamentos (1,2), y en su caso, la legislación sobre organismos modificados genéticamente (3,4). Sin embargo, hay que tener también en cuenta los requisitos específicos sobre medicamentos de Terapia Génica en el contexto de las normas sobre registro de medicamentos. En este capítulo se pretende dar una visión global del marco legal mencionado.

Normativa europea

Desde el 1 de mayo de 2004, fecha límite para la entrada en vigor de la Directiva 2001/20/CE (5), los países del Área Económica Europea tienen, por primera vez, un marco legal común que regula los ensayos clínicos con medicamentos cuyo objetivo básico es garantizar el bienestar y respeto a los derechos de los sujetos participantes en la investigación, así como la calidad de los resultados que se obtengan. Además, este marco fomenta la transparencia respecto a la investigación realizada.



Agencia Europea de Medicamentos. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) es un organismo descentralizado de la Unión Europea que tiene su sede en Londres. Su principal responsabilidad es la protección y promoción de la salud pública y animal, mediante la evaluación y supervisión de los medicamentos de uso humano y veterinario. Es responsable de la evaluación científica de las solicitudes europeas de autorización de comercialización de medicamentos. (http://europa.eu/agencies/community_agencies/emea/index_es.htm)

Los fundamentos más importantes son:

- La *protección de los sujetos del ensayo*, mediante las garantías científicas del ensayo, el respeto a los principios éticos que deben regir toda investigación biomédica y la obligación de disponer de un seguro que cubra los daños que pudiera sufrir el sujeto como consecuencia de su participación en el ensayo.
- El cumplimiento de las *Normas de Buena Práctica Clínica (BPC)*.

- La calidad de los medicamentos en investigación, mediante la aplicación de las *Normas de Correcta Fabricación* Europeas en el proceso de su elaboración, en especial el Anexo 13.

- *Garantía pública* de que dichos requisitos se cumplen, mediante la evaluación independiente de los proyectos en cada Estado por un Comité Ético (en nuestro País Comité Ético de Investigación Clínica ó CEIC), y su autorización por parte de la Autoridad Competente (en nuestro País la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios ó AEMPS).

- La obligatoriedad de aplicar el *dictamen único* dentro de un plazo máximo. Esto supone que con independencia del número de Comités Éticos existentes en un Estado, el dictamen ético sobre el ensayo debe ser uno solo aplicable en todo el Estado.

- Un *formato estándar de la documentación* del ensayo clínico para toda la Comunidad Europea.

- Obligatoriedad de registrar todos los ensayos clínicos con algún centro participante de la Comunidad Europea en *una Base de Datos Europea de Ensayos Clínicos (EudraCT)*, y todas las reacciones adversas graves e inesperadas que ocurran en ellos en *una Base de Datos Europea de Reacciones Adversas (EudravigilanceCT)*. Estas bases de datos actualmente son accesibles solo para las autoridades competentes que autorizan los ensayos clínicos, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Comisión Europea.

- Se prohíben los ensayos clínicos con medicamentos de Terapia Génica que produzcan modificaciones en la identidad génica de la línea germinal del sujeto.

- Se potencia la cooperación entre las autoridades competentes en el Área Económica Europea, especialmente en materia de inspección.

Cabe señalar que muchos de estos requerimientos ya constaban en la legislación de ensayos clínicos de 1993 (6).

La Directiva 2001/20/CE (5) ha sido desarrollada mediante dos Directivas de la Comisión (7,8) y abundantes documentos de recomendaciones recientemente recopiladas en el Volumen 10 de la Legislación Farmacéutica Europea (9). Todos ellos se resumen en la **Tabla I**.

Normativa Española

En España, el marco legal que regula con carácter general los ensayos clínicos con medicamentos está constituido por la recientemente aprobada Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (1), que ha sustituido a la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento (10), con sus normas de desarrollo.

El Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero de 2004, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos (2), constituye la norma de desarrollo más extensa y específica, y en ella, además, de incorporar a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2001/20/CE, hace referencia a otras normas, mediante la necesidad de garantizar la protección de datos (11,12) o la necesidad de que los medicamentos en investigación se elaboren siguiendo las normas europeas de correcta fabricación (13,14).

Con el fin de aclarar la documentación del ensayo que debe presentarse a la AEMPS y a los CEIC y disipar otras dudas planteadas con frecuencia por los promotores, la AEMPS ha

elaborado el documento "Aclaraciones sobre la aplicación de la normativa sobre ensayos clínicos desde el 1 de mayo de 2004" (15) que se actualiza periódicamente.

Tabla I
Resumen de la normativa de desarrollo de la Directiva 2001/20/CE de la colección EudraLex (Ref. 9)

Norma	Objeto de aplicación
Directiva 2001/20/CE (5), transpuesta mediante el Real Decreto 223/2004 (2)	Primera norma de ámbito comunitario que regula los ensayos clínicos en la Comunidad Europea.
Guía sobre la documentación para las Autoridades competentes (16)	Describe la documentación del ensayo clínico.
Guía sobre los requisitos sobre la documentación de la parte de calidad del Expediente de Medicamentos en Investigación (28)	Se refiere a los datos que son necesarios incluir en la parte de calidad del expediente de medicamentos en investigación para los medicamentos de naturaleza química o plantas medicinales, teniendo en cuenta la fase del ensayo.
Guía sobre la documentación para los Comités Éticos (17)	Describe la documentación del ensayo que debe presentarse a un Comité Ético, antes del inicio del ensayo (nuevo protocolo) después de comenzado el ensayo (modificaciones relevantes y datos de seguridad) y una vez finalizado el ensayo (notificación de la finalización del mismo).
Guía sobre EudraCT (19)	Describe las características de la aplicación EudraCT.
Guía sobre aspectos de seguridad (20)	Se refiere al seguimiento de la seguridad en el ensayo, especialmente a la recogida, verificación y notificación de reacciones adversas ocurridas en ensayos clínicos.
Guía sobre EudravigilanceCT (26)	Guía sobre las características de la base de datos europea en la que se deben registrar todas las notificaciones de reacciones adversas graves e inesperadas asociadas a los medicamentos en investigación.
Directiva de la Comisión 2005/28/CE, de 8 de abril (7). Está en trámite de transposición mediante una orden ministerial.	Establece los principios y guías detalladas de las normas de buena práctica clínica en lo que se refiere a ensayos clínicos con medicamentos de uso humano, así como los requisitos para la autorización de fabricación o importación de estos medicamentos y sobre las inspecciones.
CPMP/ICH/135/95 Guía sobre normas de Buena Práctica Clínica (18)	Documento que define los principios y estándares de BPC aceptados por los países que participan en la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).
Recomendaciones sobre el contenido del archivo maestro y métodos de archivo (27)	Se refiere a los documentos que como mínimo deben guardarse en el archivo, la calidad de los mismos, los estándares mínimos que deben reunir las condiciones de archivo y la duración del almacenamiento.
Directiva 2003/94/EC (8) de la Comisión de 8 de octubre, transpuesta mediante el Real Decreto 223/2004 (2) y Real Decreto 2183/2004 (13)	Se refiere a los principios y normas de correcta fabricación que deben cumplir los medicamentos en investigación (14)

Solicitud de autorización de un ensayo clínico por la AEMPS o de dictamen por el CEIC

En todo ensayo clínico el *promotor* es la persona física o jurídica responsable de la realización del ensayo clínico en España (Artículo 35 del Real Decreto 223/2004) (2). Debe ser único e idéntico en todos los documentos.

La documentación del ensayo que se remite a la AEMPS o al CEIC debe ser presentada por el *solicitante* que debe ser el promotor o una persona física o jurídica autorizada por éste.

Los documentos que deben presentarse para solicitar la autorización inicial del ensayo a la AEMPS o el dictamen del CEIC se describen en la **Tabla II**. La mayoría de estos documentos deben estructurarse conforme a criterios europeos, destacando entre ellos el *protocolo*, el *manual del investigador* y el *expediente del medicamento en investigación*.

El *Protocolo* es el documento donde se describe el ensayo clínico. Su estructura y contenido deben ajustarse a lo indicado en las guías europeas sobre la documentación del ensayo para la autoridad competente (16) y para el Comité Ético (17) y, por tanto, a la Sección 6 del documento CPMP/ICH/135/95 de Normas de Buena Práctica Clínica (18). En él, debe

consignarse también lo siguiente: i) Justificación, en su caso, de la inclusión de menores, o incapacitados; ii) Definición de qué se considerará final del ensayo clínico y cuáles son las previsiones de tratamiento o seguimiento de los sujetos una vez finalizado el ensayo cuando éstos no sean los propios de la práctica clínica habitual; iii) Firma del investigador coordinador del ensayo o de los investigadores principales; iv) En los ensayos internacionales, cuando el promotor en España sea diferente del promotor en otros países, esto deberá constar en el protocolo. En este caso se documentarán las previsiones de gestión y análisis integrado de los datos.

Todo ensayo clínico debe identificarse mediante dos elementos que deben permanecer invariables a lo largo de todo el ensayo (15,16): El *Código del Promotor* asignado por éste, que contendrá un máximo de 35 caracteres alfanuméricos sin espacios y sin incluir fechas o versiones y el *Número EudraCT* que se asigna de forma centralizada en la web de la EudraCT (15,19) con el formato AAAA-NNNNNN-CC. El *título* debe acompañarse de un *número de versión o fecha*. Estos últimos no deben cambiar al traducir la versión original del protocolo.



Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios tiene como función garantizar a la sociedad la calidad, seguridad, eficacia y correcta información de los medicamentos y productos sanitarios en el más amplio sentido, desde su investigación hasta su utilización, en interés de la protección y promoción de la salud de las personas y de los animales. Desarrolla su labor desde la perspectiva de servicio público, priorizando el interés de los pacientes y de los profesionales sanitarios, asumiendo la responsabilidad y el deber de ser el referente científico-técnico en relación con los medicamentos y productos sanitarios y con la responsabilidad de promover el progreso social que los avances en terapéutica implican, trabajando en colaboración con las Autoridades sanitarias, tanto nacionales como europeas.
<http://www.agemed.es/>

La información sobre los medicamentos en investigación para los investigadores debe constar en el *Manual del Investigador*. Este documento contiene los datos no-clínicos y clínicos que avalan el uso de los medicamentos en investigación en las condiciones del ensayo clínico (16,17). Su estructura debe ajustarse a la Sección 7 del documento CPMP/ICH/135/95 de normas BPC (18). Cuando el medicamento esté autorizado en algún Estado Miembro, podrá sustituirse por la ficha técnica sola o acompañada de los datos que justifiquen el uso del mismo en las condiciones del ensayo, cuando éstas difieran de las que constan en la ficha técnica.

El *Manual del Investigador* será la referencia para evaluar el carácter esperado o no de una reacción adversa (20). Es necesario para cada medicamento en investigación, aunque la cantidad de información dependerá de la situación de autorización del mismo. Cuando los medicamentos en investigación estén autorizados en España, y en el ensayo clínico el tratamiento se defina por principio activo, aceptándose el uso de cualquier marca comercial, el promotor elegirá una ficha técnica modelo para cada grupo de medicamentos con igual composición. En los ensayos clínicos internacionales, en los que el medicamento está autorizado en varios países, el promotor deberá elegir la ficha técnica que utilizará en todos los países como equivalente al *Manual del Investigador*.

Tabla II
Documentación necesaria para el inicio de un ensayo clínico

Solicitud Inicial	
Destinatario de la documentación	Documentación
AEMPS y CEIC	Carta de acompañamiento; formulario de solicitud; protocolo; Manual del Investigador; hoja de información para el paciente.
AEMPS	Archivo XML ("Full") obtenido en EudraCT; expediente del medicamento en investigación abreviado o completo; documentación que acredite el cumplimiento de normas de correcta fabricación en el caso de medicamentos no autorizados en el Área Económica Europea (15); solicitud de calificación de PEI; recibo del pago de la tasa de ensayo clínico; copia del dictamen del CEIC (antes del día 60); copia de la conformidad de la dirección de, al menos, uno de los centros incluidos en el dictamen del CEIC (antes del día 60).
CEIC	Documentación del consentimiento informado; plan de reclutamiento de los sujetos; seguro o garantía financiera o documento de asunción de responsabilidad. Para cada centro: Idoneidad de los investigadores; idoneidad de las instalaciones; memoria económica.
Solicitud de modificaciones relevantes	
AEMPS y CEIC	Carta de acompañamiento; formulario de solicitud; extracto de los documentos modificados; documentos modificados; información de soporte que justifique los cambios; XML del formulario de solicitud inicial si cambian los datos.

El *Expediente del Medicamento en Investigación* es un documento que debe presentarse únicamente a la AEMPS. Su contenido debe ajustarse a la Sección 4.1.6 de la Guía Europea que especifica la documentación del ensayo para las autoridades competentes (16) y puede ser completo o abreviado. Debe contener datos de calidad, no-clínicos y clínicos que justifiquen la administración de todos los medicamentos en investigación en las condiciones de uso del EC. Puede hacerse una referencia cruzada al manual del investigador para evitar la repetición de datos no-clínicos y clínicos. Generalmente, cuando un medicamento está autorizado en la Comunidad Europea este documento no es necesario.

Los medicamentos que requieren un *Expediente del Medicamento en Investigación Completo* son aquellos no autorizados en ningún Estado de la Comunidad Europea y que contengan algún principio activo que no forme parte de los medicamentos autorizados en España. Para los medicamentos de origen biológico, un fabricante diferente significa un principio activo distinto. En este caso, como parte de la documentación del ensayo debe presentarse una solicitud de *Calificación de Producto en Fase de Investigación Clínica (PEI)* (2,15).

Actualmente, los medicamentos de Terapia Génica cumplen estos requisitos y, por tanto, también necesitan la *Calificación de PEI*.

La mayoría de los ensayos clínicos se realizan con el fin de presentar sus resultados como aval para el registro de nuevos medicamentos. Por ello, en la elaboración del *Expediente del Medicamento en Investigación* se recomienda tener en cuenta la ORDEN SCO/341/2003, de 26 de noviembre (21) donde se identifica el tipo de información que es necesario presentar cuando se solicita el registro de un medicamento a la AEMPS para avalar la calidad, seguridad y eficacia de un medicamento (información química, farmacéutica y biológica respecto a la caracterización del medicamento y el proceso de fabricación, información no clínica referente a los estudios realizados en células o modelos animales, y los datos clínicos). La Sección IV de dicha orden trata los aspectos específicos que deben tenerse en cuenta para los medicamentos de terapia avanzada.

Además, otros documentos pueden ser de interés, tales como la monografía sobre los medicamentos de Terapia Génica de la Farmacopea Europea (22) o las guías elaboradas por la EMEA sobre este tipo de medicamentos.

Una vez que se recibe la solicitud de autorización de un ensayo clínico en la AEMPS se sigue el siguiente procedimiento: En los 10 días naturales siguientes a la fecha de entrada tiene lugar la validación de la solicitud. Si la solicitud contiene toda la documentación requerida, el solicitante recibe por fax una notificación de recepción de solicitud válida especificando la fecha de inicio del periodo de evaluación, que normalmente consiste en un plazo máximo de 90 días en el caso de ensayos clínicos con medicamentos de Terapia Génica, de Terapia Celular o que contengan organismos modificados genéticamente. Cuando la solicitud no es válida, el solicitante recibe también por fax un requerimiento de subsanación, al que debe responder en un plazo de 10 días naturales.

Durante el periodo de evaluación la AEMPS puede solicitar aclaraciones y la autorización será siempre resuelta no más tarde del día 90, siempre que se haya notificado previamente el dictamen favorable del CEIC y la conformidad de la dirección del centro.

En el caso de ensayos clínicos multicéntricos, la AEMPS necesita para autorizar el ensayo el dictamen favorable del CEIC de referencia y la conformidad de la dirección de, al menos, uno de los centros incluidos en el dictamen del CEIC al día 90. La conformidad de los demás centros incluidos en el dictamen del CEIC debe notificarse siempre antes del inicio del ensayo en cada centro.

Una vez iniciado un ensayo clínico éste puede sufrir modificaciones que pueden ser relevantes o no relevantes (15,16). Son relevantes, por ejemplo, las que pueden tener un impacto significativo en la seguridad o integridad física o mental de los pacientes, en los valores científicos del ensayo, en la realización o gestión del ensayo o en la calidad o seguridad del medicamento en la investigación. También los cambios en la definición de fin del ensayo, se consideran modificaciones relevantes.

Toda modificación relevante requiere la evaluación previa por el CEIC y/o la AEMPS. Las modificaciones relevantes que se refieran a documentos específicos de la AEMPS o el CEIC solo se evaluarán por quien hizo la evaluación inicial (AEMPS o CEIC). En este caso, se enviará solo el formulario de solicitud a título informativo a la otra parte no involucrada en la evaluación. Por ejemplo, la incorporación de nuevos centros o investigadores españoles a un ensayo clínico es una modificación relevante que solo requiere la evaluación del CEIC. La notificación con carácter informativo a la AEMPS se realizará con carácter previo al inicio del ensayo en el nuevo centro, una vez que se disponga del dictamen del CEIC y conformidad de la dirección del centro.

No debe solicitarse ninguna modificación relevante durante el proceso de evaluación del ensayo por el CEIC o la AEMPS salvo que exista un acuerdo previo. Cuando la AEMPS o el CEIC soliciten hacer modificaciones durante la tramitación de la solicitud, el promotor al responder debe identificar los cambios realizados con un número de modificación. De esta manera, la modificación podrá constar en el dictamen del CEIC y en la autorización de la AEMPS correspondientes. Cuando la modificación se realice a instancias de la AEMPS, el promotor informará al CEIC de los cambios requeridos por la AEMPS. La reevaluación de la modificación por el CEIC se requerirá solo si lo indica la AEMPS.

Si se dieran circunstancias que pudieran poner en peligro la seguridad de los sujetos, el promotor y el investigador adoptarán las medidas urgentes oportunas para proteger a los sujetos de cualquier riesgo inmediato. El promotor notificará dichas circunstancias y las medidas adoptadas tan pronto como sea posible, y en un plazo no superior a 15 días a la AEMPS y al CEIC. El reinicio de un ensayo clínico previamente interrumpido o suspendido se considera una modificación relevante.

Seguimiento de la seguridad por el Promotor

La vigilancia de la seguridad de los medicamentos en investigación está regulada en el Capítulo XI del Real Decreto 223/2004 (2), debiendo tenerse en cuenta, además, la Guía Europea al respecto (20).

El promotor debe velar por la seguridad de los sujetos del ensayo. A estos efectos, debe tener un registro de los acontecimientos adversos notificados, establecer estructuras y procedimientos normalizados de trabajo que garanticen los estándares de calidad en la documentación, recogida de datos, validación, evaluación, archivo y notificación de los acontecimientos adversos.

Es importante que la información relevante sobre los aspectos de seguridad relacionados con el ensayo se distribuya por el promotor de forma ágil a los implicados en el ensayo. Esto conlleva la notificación expeditiva de las reacciones adversas graves e inesperadas (SUSAR) y de los hallazgos que pudieran tener un impacto negativo en la salud de los sujetos o en la realización del ensayo o alterar la autorización del ensayo a investigadores, CEICs, AEMPS y autoridades sanitarias en las Comunidades Autónomas. Además, al menos de forma anual, y cuando sea necesario, deben prepararse informes de seguridad sobre los medicamentos que se investigan.

El procedimiento de notificación expeditiva de SUSARs en nuestro País se describe en el documento "*Aclaraciones sobre la aplicación de la normativa de ensayos clínicos desde el 1 de mayo de 2004*" (15).

Normativa específica sobre medicamentos de Terapia Génica

Los medicamentos de Terapia Génica forman parte, junto con los medicamentos de Terapia Celular, de lo que se denominan "Terapias avanzadas", cuya definición consta en el Artículo 47 de la Ley 29/2006 (1).

Actualmente, existe una propuesta de nueva normativa comunitaria de terapias avanzadas que incluye tanto a los medicamentos de Terapia Génica como a los de Terapia Celular y los de Ingeniería Tisular (23).

Respecto a las células modificadas genéticamente, conviene saber que los requisitos referentes a la calidad y seguridad de las células y tejidos se ha regulado a nivel comunitario mediante la Directiva 2004/23/CE (24) del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la conservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, que ha sido desarrollada por la Directiva 2006/17/CE (25) de la Comisión, de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos. Esta normativa está en trámite de transposición al ordenamiento jurídico nacional.

Del Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la Agencia Europea de Medicamentos depende el grupo de trabajo sobre Terapia Génica (GTWG) constituido por expertos en la materia de diferentes Estados Miembros y que ha elaborado guías de interés (29). Existe la posibilidad de asistir en la EMEA a lo que se denominan "*briefing meetings*" cuyo objetivo es proporcionar un foro de discusión informal entre solicitantes y reguladores (GTWP) previo a cualquier procedimiento como puede ser la designación de un medicamento huérfano, el asesoramiento científico o la solicitud de un registro para los medicamentos de Terapia Génica. El objetivo de estas reuniones puede ser múltiple, por ejemplo, para tratar aspectos de regulación o científicos o para el desarrollo de nuevos

tratamientos y tecnologías. Las reuniones tienen carácter confidencial y de las mismas se realiza un resumen —pero no un informe— y se requiere el pago de tasas.

Normativa específica sobre organismos modificados genéticamente

En el caso de la investigación con organismos modificados genéticamente es necesario, además, cumplir con la normativa específica referente a la evaluación de los riesgos de efectos adversos para el medio ambiente. Dicha norma se refiere a la Ley 9/2003, de 25 de abril (3), por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, y al Real Decreto 178/2004, de 30 de enero (4) que la desarrolla. Igualmente, es de aplicación la normativa adicional en esta materia de cada Comunidad Autónoma.

En la página web del Ministerio de Medio Ambiente (30) enlazando con "*Calidad y Contaminación*" y "*Organismos modificados genéticamente (OGM)*" se puede encontrar más información. Las liberaciones voluntarias de organismos modificados genéticamente autorizadas por los Ministerios de Medio Ambiente Europeos se publican por el "*Joint Research Centre*" de la Comisión Europea (31).

Referencias

1. Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. *BOE* núm. 178, de 27 de julio, pp. 28122-65.
2. Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. *BOE* núm. 33, de 7 febrero, pp. 5429-43.
3. Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. *BOE* núm. 100 de 26 de abril, pp. 16214-23.
4. Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento General para el Desarrollo y Ejecución de la Ley 9/2003. *BOE* núm. 27, de 31 de enero, pp. 4171-216.
5. Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de abril de 2001, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros sobre la aplicación de buenas prácticas clínicas en la realización de ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L121, de 1 de Mayo, pp. 34-44.*
6. Real Decreto 561/1993, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. *BOE* núm. 114, de 13 de mayo, pp. 14346-64.
7. Directiva 2005/28/CE, de 8 de abril por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de las buenas prácticas clínicas respecto a los medicamentos en investigación de uso humano, así como los requisitos para autorizar la fabricación o importación de dichos productos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L91 de 9 de abril, pp. 13-9.*
8. Directiva 2003/94/CE de la Comisión, de 8 de octubre de 2003, por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L262 de 14 de octubre, pp. 22-6.*
9. Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Clinical trials. Eudralex Vol. 10. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>.
10. Ley 25/1990, de 20 diciembre del Medicamento. *BOE* núm. 306, de 22 diciembre, pp. 38228-78.
11. Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. *BOE* núm. 298, de 14 de diciembre, pp. 43088-99. Modificada por la Ley 62/2003, de 30 de diciembre. *BOE* núm. 313, de 31 de diciembre, pp. 46874-992.
12. Real Decreto 994/1999, de 11 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contengan datos de carácter personal. *BOE* núm. 151, de 25 de junio, pp. 24241-5.
13. Real Decreto 2183/2004, de 12 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1564/1992, de 18 de diciembre, por el que se desarrolla y regula el régimen de autorización de los laboratorios farmacéuticos e importadores de medicamentos y la garantía de calidad en su fabricación industrial. *BOE* núm. 274, de 13 noviembre, pp. 37514-7.
14. Normas sobre la Correcta Fabricación. Anexo 13 sobre Fabricación de Medicamentos en Investigación. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>.
15. Aclaraciones sobre la aplicación de la normativa sobre ensayos clínicos desde el 1 de mayo de 2004. Agemed, "Investigación Clínica" y "Ensayos clínicos con medicamentos". [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.agemed.es/actividad/invClinica/ensayosClinicos.htm>
16. Guía detallada sobre el formato de la solicitud de autorización de un ensayo clínico con medicamentos, notificación de modificaciones relevantes y declaración de finalización del ensayo para las autoridades competentes. Detailed guidance for the request for authorisation of a clinical trial on a medicinal product for

- human use to the competent authorities in the European Union, notification of substantial amendments. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
17. Guía detallada sobre el formato de la solicitud y documentación referente a las solicitudes de dictamen sobre ensayos clínicos con medicamentos de uso humano que se debe remitir a los Comités Éticos. Detailed guidance on the application format and documentation to be submitted in an application for an ethics committee opinion on a clinical trial on a medicinal product for human use. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 18. CPMP/ICH/135/95 Note for guidance on Good Clinical Practice. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 19. Guía detallada sobre la base de datos de ensayos clínicos europea (EudraCT). Detailed guidance on the European database of clinical trials EudraCT, including amendment describing Deployment of EudraCT. Lot 1 for 1 May 2004 (April 2004). [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 20. Guía detallada sobre la recogida, verificación y notificación de reacciones adversas ocurridas en ensayos clínicos con medicamentos de uso humano. Detailed guidance on the collection, verification and presentation of adverse reaction reports arising from clinical trials on medicinal products for human use. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 21. ORDEN SCO/341/2003, de 26 de noviembre, que actualiza el *Anexo II* del RD 767/1993 de 21 de mayo, que regula la evaluación, autorización, registro y condiciones de dispensación de especialidades farmacéuticas y otros medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. *BOE núm. 297, de 12 diciembre, pp. 25320-93*.
 22. European Pharmacopoeia, 5th Edition, supplement. General chapter 5.14 Gene Transfer Medicinal Products for human use, pp. 4461-8. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://www.tsoshop.co.uk/bookstore.asp?FO=1167771&DI=518017>
 23. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on Advanced Therapies and amending Regulation (EC) No 726/2004. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/advtherapies/index.htm>
 24. Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L102 de 7 de abril, pp. 48-58*.
 25. Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L38 de 9 de febrero, pp. 40-52*.
 26. Eudravigilance-CT Detailed guidance on the European database of Suspected Unexpected Serious Adverse Reactions (Eudravigilance–Clinical Trial Module). [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 27. Recommendation on the content of the trail master file and archiving. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 28. CHMP/QWP/185401/2004 final Guideline on the requirements to the chemical and pharmaceutical Quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trials. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev10.htm>
 29. Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la Agencia Europea de Medicamentos. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: <http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/CHMP/CHMP.html>
 30. Calidad y Contaminación y Organismos modificados genéticamente (OGM). Ministerio de Medio Ambiente. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/omg/
 31. Liberaciones voluntarias de organismos modificados genéticamente autorizadas por los Ministerios de Medio Ambiente Europeos. Joint Research Centre de la Comisión Europea. [Consultado 10/03/2008]. Disponible en: http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/omg/notificaciones_autorizaciones/liberacion_procedimiento.htm

CAPÍTULO 16

Terapia Génica y Eugenesia. Una perspectiva ética

José Luis Velázquez

¿Es posible conciliar la ética con la eugenesia? ¿Existe alguna perspectiva que justifique moralmente las prácticas agrupadas bajo el nombre de eugenesia basadas en la ingeniería genética (IG)? En este capítulo se exponen diversos argumentos con el propósito de justificar las dos variantes más controvertidas de la eugenesia (la eugenesia basada en la Terapia Génica sobre la línea germinal y la eugenesia orientada a mejorar o reforzar la dotación genética) lo que llevará a revisar algunas posiciones partidarias de la prohibición y de la restricción más estricta.

La palabra “eugenesia”

La palabra “eugenesia”, como los nombres propios Eugenio y Eugenia, viene del griego *eugenés* que significa bien nacido. Hoy día, por eugenesia entendemos la aplicación de los principios de la genética y la herencia con el objetivo de que los nacidos incorporen una combinación de características deseables o carezcan de una combinación no deseada de características físicas o mentales.



A comienzos del siglo XX, los partidarios de la eugenesia estaban más preocupados por la salud colectiva o de la población que por la salud de los individuos. Los objetivos que se perseguían eran tanto negativos (reducir efectos disgénicos, eliminar enfermedades y trastornos y controlar la reproducción de ciudadanos menos sanos y capaces) como positivos (mejorar la salud de la población incentivando la reproducción de aquellos con mejores rasgos. En principio, esta diferencia no marcaba ninguna distinción

moral relevante y se consideraban dos aspectos de un mismo objetivo. Aunque la orientación inicial de este movimiento no cabe asociarla a posiciones reaccionarias o conservadoras, pronto adquirió un sesgo racista y elitista como se comprobó en las prácticas promovidas por el gobierno americano en los años 20 y en Alemania durante los años 30 del siglo pasado. Estos y otros lamentables acontecimientos contribuyeron a asociar a la eugenesia con una concepción errónea de la genética, la promoción de la idea del superhombre o una raza superior y la ideología de gobiernos autoritarios (1). El horror y los abusos permitieron articular un consenso amplio y generalizado en contra de la eugenesia basado en la defensa de los derechos humanos promulgados en 1948 (2). En esencia, se asumió que si la eugenesia representaba una violación de las libertades y derechos individuales y una amenaza para la consolidación de la igualdad, debía ser prohibida.

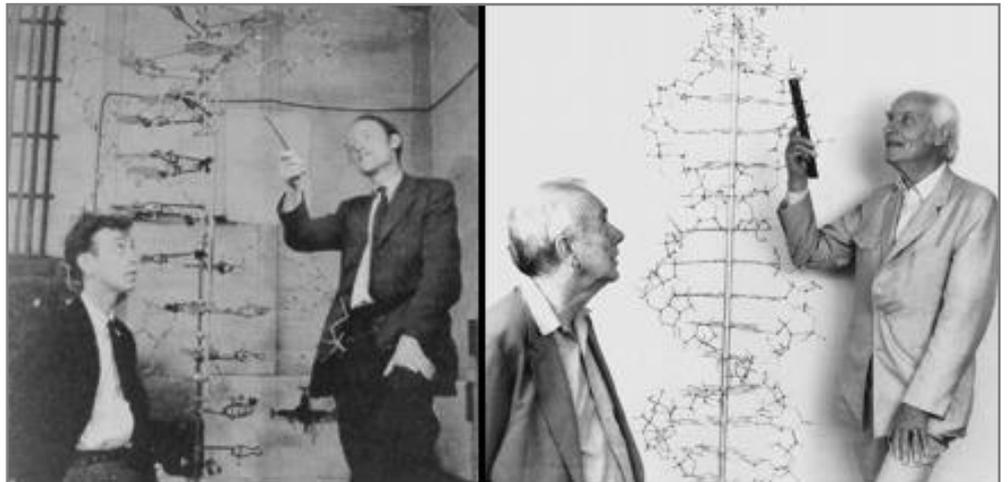
¿Significa esto que cualquier forma de eugenesia es moralmente inaceptable? En primer lugar, hay que decir que hay distintas formas de alterar la dotación genética de las

generaciones futuras, a parte de las modificaciones génicas selectivas y con fines terapéuticos que están ampliamente aceptadas. La extensión de la sanidad, la erradicación de la pobreza, las políticas orientadas a cambiar las pautas de procreación, el aborto o los diagnósticos genéticos preimplantatorios constituyen medios que, si bien alteran el aspecto genético, no van acompañados de resquemor o excesivos temores. Quiere esto decir, que en materia de eugenesia lo que está expuesto a objeciones morales no son tanto estos sofisticados recursos como el hecho de que se impongan de manera coercitiva y violando la libertad individual. Por ejemplo, a nadie se le puede impedir si así lo desea emparejarse sexualmente con una persona que pueda transmitir alguna enfermedad hereditaria. Del mismo modo, que una persona deseosa de tener un hijo que padecerá el síndrome de Down está en su derecho de continuar el embarazo y negarse a recurrir al aborto. ¿Por qué suscita entonces tanto rechazo la utilización de estrategias relacionadas con la ingeniería genética para eliminar enfermedades genéticas de las generaciones futuras o para mejorar la dote genética?

Implicaciones morales de las intervenciones genéticas

A la hora de examinar las implicaciones morales de las intervenciones genéticas se suele hacer una doble diferenciación. En función del ámbito de aplicación, se distingue entre TGLS (Terapia Génica sobre la línea somática) y TGLG (Terapia Génica sobre la línea germinal) y en función del objetivo perseguido, se habla de fines terapéuticos y fines perfectivos (3). Muchos mantienen que estas distinciones coinciden con barreras morales. Así, mientras la TGLS es éticamente aceptable y la TGLG no lo es, los fines terapéuticos son admisibles y los fines perfectivos no. La TGLS consiste en actuar sobre el DNA de las células somáticas de un individuo, lo cual

significa que cualquier cambio que tenga lugar sólo afectará al individuo en cuestión y no se transmitirá a sus descendientes. El parecido con otro tipo de intervenciones médicas, la posibilidad de contar con el consentimiento



del paciente y la finalidad terapéutica, convierten inicialmente a la TGLS en una práctica moralmente aceptable. En cambio, la TGLG al realizarse sobre las células germinales que darán lugar al embrión, afectará no sólo al genoma del individuo que va a nacer sino también a toda su prole. Esta técnica es objeto de una fuerte controversia no sólo por razones técnicas (poco desarrolladas y arriesgadas) sino por razones morales ya que no es posible contar con el consentimiento informado ni del embrión, ni del feto, ni de las generaciones futuras. Debido a ello carece de la aprobación moral y social. Y en lo que se refiere a la valoración de la Terapia Génica en base a sus objetivos se considera moralmente aceptable cuando se trata de atender una enfermedad y recobrar la salud e inmoral cuando se persigue mejorar la salud.

Esta clasificación puede desafiarse de varios modos. Respecto a la primera parte de la clasificación cabe hacer las siguientes consideraciones. En primer lugar, algunas terapias sobre la línea somática pueden derivar en una expresión genética defectuosa y dar lugar a la proliferación de un cáncer obligando a una intervención quirúrgica o quimioterápica. En segundo lugar, sería a todas luces una imprudencia llevar a cabo tratamientos basados en la

TGLG sin haber realizado previamente ensayos y experimentos sobre modelos animales con el fin de aumentar la eficacia y la seguridad. Sin embargo, habría que recordar que existen tratamientos contra el cáncer, como la radiación y la quimioterapia, que afectan a la línea germinal de pacientes masculinos y que pueden producir esterilidad, malformaciones en los descendientes o leucemia. En tercer lugar, no se puede olvidar que puede haber parejas que prefieran optar antes por la TGLG *in útero* que por la selección preimplantatoria o someterse a reiterados tratamientos de FIV (fecundación *in vitro*). Y por último, cuando se esgrime el grave riesgo que corren las generaciones futuras en el caso de aceptarse la TGLG, habría que preguntar a la sociedad si está dispuesta a asumir las consecuencias derivadas de nacimientos con anomalías hereditarias o si, por el contrario, entiende que la decisión debe tomarse basándose en una combinación de criterios tales como el fomento de la investigación, la libre decisión de los padres, el consejo y asesoramiento genético, la disponibilidad de recursos, etc.

Tratamiento terapéutico y eugenesia perfectiva

La polémica distinción entre tratamiento terapéutico y eugenesia perfectiva incluye tanto el objetivo de mejorar como de enriquecer el acervo genético de los seres humanos. Con independencia de la estrategia empleada (TGLS o TGLG), científicos y expertos en bioética vienen discutiendo desde hace años si la legitimidad de estas estrategias radica en el objetivo perseguido o en otros factores. La opinión generalizada es que mientras que la Terapia Génica es moralmente aceptable porque sirve a nobles fines médicos como la erradicación y prevención de enfermedades, no es así para el enriquecimiento genético o la eugenesia perfectiva que no es aceptable. Se considera moralmente bueno evitar un mal, pero moralmente inadmisibles mejorar la situación de alguien que no padece enfermedad o trastorno genético causante de sufrimiento. Hay diferencia entre ingerir esteroides para recuperar la fuerza muscular después de una operación y tomar esteroides para aumentar la capacidad de competición deportiva, la misma —se nos dice— que hay entre emplear la Terapia Génica para aumentar la altura de un niño con deficiencia en la hormona del crecimiento o emplearla para aumentar la altura de un niño con estatura media que quiere dedicarse al baloncesto. Ahora bien, si hacemos depender la distinción moral de la distinción semántica que hay entre salud y enfermedad, entonces será difícil salir de la arbitrariedad. El hecho de que exista una frontera entre Francia y España no es incompatible con que a veces dudemos si estamos en un país o en el otro, lo cual no quiere decir que nunca sepamos si pisamos suelo francés o español. La enfermedad ya se defina en términos estadísticos, funcionales o sociales o en términos de limitación para llevar a cabo planes de importancia vital para el individuo, no puede ser el único criterio para dictaminar la moralidad de emplear recursos genéticos (4). Como ha escrito J. Harris, el motivo moral para emplear tecnologías genéticas para interceder en la lotería de la vida debe ser perseguir el bien y esto incluye tanto la erradicación de enfermedades como la mejora de las capacidades de los seres humanos. Lo que quedaría por decidir sería la forma de acceder a estos bienes ya sea en su versión terapéutica o en su versión eugenésica perfectiva sin vulnerar los derechos humanos y los valores morales implicados en ellos.

Sin entrar, por el momento, en otras consideraciones que se tratarán más adelante, el argumento que han defendido Glover, Harris y Silver (5,6,7) a favor de la mejora genética merece una atención. Para estos autores, encuadrados en el ambiguo bando de la "eugenesia liberal", la clave reside en el derecho o la libertad de autonomía para reproducirse y en el bienestar de las generaciones futuras o lo que es lo mismo, la libertad para reproducirse o no y el derecho a elegir el tipo de descendencia. Si los padres tienen libertad para influir y determinar los factores externos relacionados con el bienestar de los hijos, entonces la decisión de mejorar la dotación genética tiene que ser evaluada con el mismo criterio. O dicho de otro modo, si los padres pueden mejorar las condiciones de vida de su descendencia mediante una alimentación adecuada, asistencia sanitaria y una buena educación, entonces los padres deberían ser libres para proporcionar el componente genético de los rasgos deseados. A muchos esta analogía puede parecerles parcial toda vez

que la evaluación moral del enriquecimiento o mejoramiento genético no se puede resolver simplemente apelando, por un lado, a la equiparación de los bienes genéticos con otro tipo de bienes socialmente reconocidos —salud, alimentación, asistencia sanitaria, educación— y, por otro lado, justificando la modificación del genoma humano mediante la IG sobre la base de la libertad o el derecho reproductivo de los padres para mejorar las condiciones de vida de sus descendientes. Se objeta, por ejemplo, que este tipo de decisiones no pueden considerarse aisladamente pues tienen lugar en un marco de relaciones sociales donde, además, de la libertad individual, otros valores como la igualdad y la justicia tienen que ser preservados. Con este propósito la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997) en su Artículo 24 invita al Comité Internacional de Bioética de la UNESCO a la identificación de prácticas que pueden ir en contra de la dignidad humana, como es el caso de las intervenciones en la línea germinal, en clara alusión, sin duda, a la Terapia Génica germinal. Por su parte, el Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (Convenio Europeo de Bioética) de 1997 establece en su Artículo 13 que "únicamente podrá efectuarse una intervención que tenga por objeto modificar el genoma humano cuando existan razones preventivas, diagnósticas o terapéuticas y sólo cuando no tenga por finalidad la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia". Por tanto, queda prohibida la Terapia Génica germinal.

A la *Declaración* no le faltan méritos, entre los cuales no está ni mucho menos la claridad conceptual. De hecho, muchos han extraído la conclusión apresurada de que es imposible conciliar el respeto a los Derechos Humanos y el enriquecimiento genético. Un ejemplo lo encontramos en las palabras del premio Nóbel *Peter Medawar* quien sostiene que "*no se puede practicar un régimen de mejoramiento genético en el marco de una sociedad que respete los derechos individuales*".

La igualdad y la justicia en el mejoramiento genético

Como resulta imposible entrar a analizar todos los conflictos supuestos o reales entre el mejoramiento o enriquecimiento genético y cada uno de los derechos o valores morales amparados en ellos, sólo se pasará revista a dos de ellos: la igualdad y la justicia. Lo primero que hay que preguntarse es en qué medida el mejoramiento genético viola el principio de que todos los hombres están sujetos a iguales derechos. Para abordar esta cuestión se pueden utilizar algunos ejemplos procedentes de Harris y Silver. Supongamos que gracias a la IG se lograra crear una variante de la especie humana dotada de un genoma nuevo con 54 pares de cromosomas y completamente diferente a la del resto de los seres humanos. Esta casta, los "Génricos", se distinguiría de los seres humanos naturales por poseer un sistema inmunitario reforzado de probada eficacia contra el riesgo de contraer el SIDA, la hepatitis o la malaria. Imaginemos, además, que carecieran de cualquier predisposición para enfermedades del corazón y aún más, pensemos que han sido modificados para retrasar el envejecimiento y disfrutar de una sensibilidad para la música fuera de lo común. Nos encontraríamos, por tanto, en una situación en la que unos individuos decidiendo, libre y voluntariamente, invertir sus recursos en modificar genéticamente a sus hijos, para que éstos se beneficiaran de unas ventajas y cualidades de las que otros carecerían



Esta situación hipotética sería en principio admisible en el supuesto de que se hubiera alcanzado sin la imposición por la fuerza de una política reproductiva hacia un grupo de la población y sin conculcar el derecho a la reproducción. Tampoco el Estado habría seleccionado previamente determinados rasgos ni habría tratado de imponerlos a determinados sectores de la población bajo criterios de perfección. Dicho esto, llega el momento de poner a prueba al mejoramiento genético a la luz de la igualdad. Y es que la sombra que ronda no es otra que la de la discriminación entendida como un tratamiento desigual e injustificado contra determinadas personas (8). Son, al menos, dos tipos de discriminación los que pueden producirse y que confrontarían con nuestro compromiso con la igualdad moral. El primer tipo de discriminación se produciría cuando se admitiera una diferencia previa de valoración de los seres humanos. En nuestro caso queda ejemplificado si se superpone algún aspecto específico de la condición genética humana frente al núcleo de la condición moral. Con el objetivo de evitar esta consecuencia, la Declaración del Genoma Humano ha propuesto que los Estados se comprometan con el Artículo 1 que dice: *“Todo individuo tiene derecho al respeto de su dignidad cualesquiera que sean sus características genéticas. Esta dignidad es la que impone que no se reduzca a los individuos a sus características genéticas”*.

No menos complicado parece el problema de superar el otro tipo de discriminación resultante de la situación ventajosa en la que se sitúan los “Génricos” frente al resto de la población en términos de capacidad, oportunidad y libertad para adquirir más bienes. Si el acceso a los bienes eugenésicos —terapéuticos o no— solo queda restringido a los más ricos, entonces la sociedad quedaría dividida entre los “Génricos” y unos nuevos parias identificados con una dotación genética y unos caracteres o rasgos de orden inferior. ¿Cómo se puede entonces conciliar el mejoramiento o enriquecimiento genético con las exigencias de la justicia?

La intervención estatal en la distribución de recursos puede garantizar la oportunidad de acceder a una serie de bienes que por su elevado precio solo estaría en manos de los más ricos. Como sabemos un estado democrático tiene que estar comprometido con una distribución justa de los bienes, los recursos y las oportunidades pues solo así se puede llegar a garantizar y concretar los ideales de libertad y de justicia. Si consideramos que los bienes genéticos pueden contribuir a mejorar la calidad de vida de los ciudadanos y hacer realidad las expectativas sobre determinados planes de vida, es precisa la intervención del Estado. Y aquí los interrogantes caen por su propio peso: ¿Cómo se tienen que distribuir esos recursos eugenésicos? ¿Pueden permitirse los estados unas inversiones tan grandes en mejorar la dotación genética de aquellos que disfrutan de una salud normal cuando todavía no se han erradicado enfermedades cuyos remedios son conocidos?

Frente a las propuestas de corte ultraliberal que privilegian las normas del mercado, exaltan la libertad individual y privilegian el pleno derecho a la autonomía reproductiva, existe otra perspectiva partidaria de la conciliación de la libertad individual y la justicia económica y social. Esta perspectiva examina la forma de atender dos objetivos sociales complementarios, uno garantizar las oportunidades de todos los ciudadanos para acceder a bienes básicos (alimentación, asistencia sanitaria y educación) y otro favorecer a aquellos que sufren algún tipo de daño ocasionado por una dotación genética defectuosa mediante programas de atención sanitaria. Si todavía no se ha podido encontrar un modelo ideal para la distribución de bienes tradicionales, difícilmente se puede esperar una sencilla solución para atender a este nuevo tipo de demandas relacionadas con el enriquecimiento genético (9). Esta y muchas otras dificultades afines no deberían, a pesar de todo, empujarnos a pensar que el único principio guía para distribuir recursos escasos, como son las peculiares características de los bienes eugenésicos, sea la ley del “todo o el nada”. Sería tanto como afirmar que si muchos estudiantes no pueden acceder a estudios superiores en la Universidad de Harvard, hay que impedir la entrada a todos los estudiantes que deseen estudiar allí.

¿Se precisa una nueva bioética?

¿Necesitamos una nueva bioética para abordar los problemas y los desafíos de la eugenesia basada en la Ingeniería Genética? La perspectiva de los derechos humanos es conciliable con los nuevos recursos y tecnologías genéticas a pesar de existir mucha incertidumbre sobre sus posibilidades y usos futuros. Sin embargo, sería inútil buscar en ese catálogo una respuesta exacta y convincente a todos los problemas; más bien lo que precisamos son interpretaciones y ajustes para no perder de vista la libertad ni tampoco renunciar a los muchos beneficios que pueden reportar las biotecnologías. De ahí, la necesidad de volver a revisar una cuestión muy antigua pero que cobra de nuevo actualidad a la luz de las aportaciones de las ciencias biomédicas. ¿Cabe la posibilidad entonces de hacernos más humanos empleando las biotecnologías? Todo dependerá de dónde apuntemos la imagen de la libertad y la imagen del ser humano. Fukuyama (10), por ejemplo, considera que libertad de investigación ilimitada y derechos reproductivos ilimitados representan libertades falsas frente a la libertad de las comunidades políticas para proteger los valores predilectos como puede ser “la existencia de una esencia humana estable de la que estamos provistos por naturaleza”. En un tono parecido se pronuncia Habermas (11) cuando sostiene que si bien algunas formas de modificación genética y diagnóstico genético preimplantatorio son moralmente aceptables, permitir objetivos más allá de la eugenesia negativa supone una amenaza para las generaciones futuras y para su estatuto moral de libertad e igualdad porque da lugar a una relación asimétrica entre los progenitores y los hijos. ¿Qué se puede replicar? Fukuyama dice que resulta absurdo restringir la libertad individual en aras de la libertad “de la comunidad política”. El hecho de permitir a los individuos tomar sus propias decisiones sobre la dotación genética de los hijos no obliga a que todos sigan el mismo camino o elijan las mismas características. Y habría que recordar a Habermas que incurre en el error de pensar que mientras el azar garantiza la libertad para elegir el destino, la modificación genética la coarta. Por el contrario, son precisamente algunas modificaciones las que pueden potenciar la libertad de elección y la autonomía. Ampliar los límites de la libertad y del conocimiento nunca será un obstáculo para el desarrollo del individuo. Al contrario, los peligros que acosan a los seres humanos son la falta de libertad y la ignorancia. Quien se niega a ser libre, quien se niega a saber más sobre sí mismo, queda condenado a ser menos humano.

Referencias

1. Gems D (1999) Politically Correct Eugenics. *Theor Med Bioeth*, 20: 201-13.
2. Código de Nuremberg. Con anterioridad a la Declaración de los DDHH, se aprobó el Código de Nuremberg (1947) como consecuencia de los juicios de Nuremberg contra los médicos nazis por los crímenes contra la humanidad. Por primera vez se recogía el requisito de contar con el consentimiento del enfermo antes de llevar a cabo intervención o experimento alguno.
3. Anderson WF (1989) Human Gene Therapy: Why Draw a Line?. *J Med Philosophy* 14: 681-93.
4. Concepto de enfermedad. Existe una amplia bibliografía sobre lo que hay que entender por enfermedad. Destacaría el significado que maneja Kitcher vinculado a la idea de calidad de vida y las trabas que se interponen para realizar planes de vida. [Kitcher P (2002) *Las vidas por venir*. Universidad Autónoma de México].
5. Glover J (1986) *El Hombre Prefabricado*. Ed. Ariel. Barcelona (Spain).
6. Harris J (2001) *Superman y la mujer maravillosa*. Ed. Tecnos. Madrid (Spain).
7. Silver L (1997) *Vuelta al Edén*. Ed. Taurus. Madrid (Spain).
8. Powers M (1996) Forget about Equality. *Kennedy Inst Ethics J*, 6: 129-44.
9. Teoría de la Justicia de Rawls. En este sentido son interesantes algunas aportaciones para sentar criterios de distribución de bienes eugenésicos a partir de la Teoría de la Justicia de Rawls. Así, Allhoff ha propuesto que las aplicaciones de la Terapia Génica sobre la línea germinal con el propósito de mejorar o fortalecer la dotación genética son moralmente aceptables si contribuyen a aumentar los bienes primarios (derechos, libertades, oportunidades, ingresos, salud, inteligencia e imaginación) [Allhoff F (2005) Germ-Line Genetic Enhancement and Rawlsian Primary Goods. *Kennedy Inst Ethics J*, 15: 39-56].
10. Fukuyama F (2002). *El Fin del Hombre*. Ed. B. Barcelona (Spain).
11. Habermas J (2002) *El futuro de la Naturaleza Humana*. Ed. Paidós. Barcelona (Spain).

Epílogo

¿Memoria o Esperanza?

Antonio Liras

Después de leer detenidamente y con entusiasmo este libro, como así se espera que haya sido, y en un acto de autoevaluación del mismo, debemos volver al principio: Terapia Génica, ¿Memoria o Esperanza?, e intentar responder a esta pregunta que formulaba el propio título del libro. Si tenemos respuesta se habrá conseguido el objetivo académico e instructor que se pretendía.

En cualquier caso, lo que está claro es que la Terapia Génica forma parte de la nueva Medicina Genómica que impondrá, ya a corto plazo, no solo la aplicación de nuevas estrategias metodológicas, sino también un cambio de mentalidad que deberá pasar, ineludiblemente, por la prevención como un primer objetivo. Esta nueva estrategia terapéutica responde a una demanda académica, científica y social pero, además, ahora estamos en disposición de resolver la incertidumbre sobre su futuro, es decir, si formará parte de la memoria histórica de la ciencia o si, por el contrario, representa una posibilidad terapéutica para algunas de las enfermedades del hombre, ya sean hereditarias, infecciosas, cardiovasculares, hepáticas, cancerígenas o de cualquier otra índole.

La Terapia Génica y la Terapia Celular podrán contribuir, de forma conjunta, a esta alternativa terapéutica del futuro, lo que llevará a establecer nuevas legislaciones adaptadas a un nuevo concepto de medicamento biotecnológico.

En el momento actual, los procedimientos de Terapia Génica pretenden, en principio, sin llegar a ser ambiciosos, ser paliativos o mejorar los tratamientos convencionales ya existentes. La prudencia debe dirigir las investigaciones en este campo con un objetivo a muy largo plazo basado en el logro de la curación. Pero, además, no se puede olvidar que la eficacia de los protocolos de Terapia Génica y su aplicación clínica dependerán de la propia patología a tratar, del estado y características clínicas del paciente y, sobre todo, de la relación entre riesgos y beneficios.

En este sentido y con el fin de no caer en falsos entusiasmos y deletéreas esperanzas para los pacientes, se debe reafirmar, por activa y por pasiva, que la Terapia Génica se trata todavía de una tecnología, fundamentalmente, experimental. Porque la realidad es que hay que solventar innumerables dificultades, especialmente en lo que respecta al vector de transducción génica. No existe un vector universal, ya que el vector ideal será aquel que mejor convenga para una enfermedad en concreto, y no otro, en función de los requerimientos de esa patología y no de otra. Además, se deberá encontrar aquel vector en que la relación entre seguridad, eficacia de transducción y tiempo de expresión respecto a los riesgos, sea la máxima posible.

Cabe esperar, en base a los conceptos teóricos de esta metodología, que serán las enfermedades monogénicas las que se verán primeramente beneficiadas por la Terapia Génica. Los resultados obtenidos hasta el momento permiten afrontar con optimismo justificado los requerimientos para una aplicación clínica de una Terapia Génica en humanos.

Será preciso que se aclaren y definan bien los conceptos éticos para la investigación en Terapia Génica y que se establezca una normativa bioética que garantice un compromiso de inversión económica en terapias génicas eficaces y seguras en beneficio de los pacientes.

Los resultados en Terapia Génica que se pueden prever más a corto plazo podrán estar relacionados con el cáncer porque las terapias actuales para esta enfermedad son insuficientes. Este hecho favorece la inversión dirigida a establecer nuevas estrategias más

novedosas y en que la Terapia Celular y la Terapia Génica tienen mucho que aportar, aún a pesar de que los abordajes en este sentido sean más complejos que, por ejemplo, para las enfermedades monogénicas.

La investigación básica mundial en Terapia Génica es muy intensa y los resultados muy esperanzadores, pero la aplicación clínica no es tan ilusionante como cabría esperar, aunque ya hay muchos ensayos clínicos en Fases I y II. Se produce la paradoja de que a pesar de que se dispone de una gran cantidad de conocimientos sobre los mecanismos moleculares fisiológicos y sobre el genoma humano, sin embargo, sigue resultando sumamente difícil interferir los mecanismos fisiológicos y, en general, aplicar todos esos conocimientos para hacer realidad eso que parece tan sencillo como es introducir un gen en un organismo y que no se produzcan efectos adversos.

El "caballo de batalla", la "piedra filosofal", el "objeto del deseo" será vencer la inmunogenicidad de los vectores, especialmente de los adenoasociados que, hoy por hoy, se consideran los más seguros y más eficaces. El "San Benito" de la Terapia Génica: considerarla una terapia alternativa o de último recurso.

Pero la realidad es que la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, la Medicina Genómica, la proteómica, la Terapia Génica, la Terapia Celular..., en conjunto como alternativa de "pluri-inter-disciplinaridad", serán la solución ideal para el futuro.

La Terapia Génica, aún con grandes posibilidades teóricas, se presenta de manera reticente en la cruda realidad terapéutica de las patologías humanas. Se debe informar a la sociedad y a los facultativos de forma realista y sin falsas expectativas sobre las posibilidades reales de esta metodología.

En resumen, podemos afirmar que la Terapia Génica es una "realidad" esperanzadora que avanza con cautela. Su historia pasada no le ha beneficiado en nada y ha ralentizado su desarrollo, ese desarrollo, general y esperado, en el camino entre Mendel y la nueva Medicina Genómica, pero también nos ha enseñado a ser más cautos, a regular más la experimentación y, sobre todo, a ser más realistas en las expectativas de éxito. Todo esto forma parte de la memoria histórica y para eso sirvió; el resto es todo esperanza.

TERAPIA GÉNICA

¿Memoria o Esperanza?

APÉNDICE I

“Websites” en Internet sobre Terapia Génica



Antonio Liras

29/02/2008

Aspectos generales sobre Terapia Génica

[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/
medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml)

Sitio elaborado por el Departamento de la Ciencia y la Energía de la Oficina de Biología y del Desarrollo dentro del Programa del Genoma Humano.

29/02/2008

Genes y Terapia Génica

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/genesandgenetherapy.html>

Sitio de información sobre diversos aspectos de la Terapia Génica, ensayos clínicos, investigación básica, etc, elaborado por el Instituto Nacional de la Salud de EEUU en colaboración con la Biblioteca Nacional de Medicina.

29/02/2008

Metodología del DNA recombinante y transferencia de genes

<http://www4.od.nih.gov/oba/Rdna.htm>

Recomendaciones ("guidelines") sobre buenas prácticas de laboratorio en técnicas de DNA recombinantes y transferencia de genes, elaboradas por el Instituto Nacional de la Salud de EEUU.

La Terapia Génica del cáncer a través de cuestiones y respuestas

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/gene>

Sitio muy práctico para aprender sobre Terapia Génica con la práctica, elaborado por el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU.

Una visión "general y particular" de la Terapia Génica

http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BA/Gene_Therapy_Overview.html

Sitio de información sobre Terapia Génica desde una perspectiva actual y desde la evolución molecular, elaborado por el Museo Nacional de la Salud de EEUU.

29/02/2008

Terapia Génica en niños. Aspectos éticos

http://kidshealth.org/parent/system/medical/gene_therapy.html

Sitio de *KidsHealth* que trata la salud infantil y de adolescentes, patrocinado por la *Fundación Nemours* para la salud infantil.

29/02/2008

Aspectos generales de Terapia Génica, bioética y regulación

<http://www.dnapolicy.org/>

Visión general de la Terapia Génica desde el punto de vista bioético y de su regulación, elaborado por Centro de Genética y de Política Sanitaria de EEUU.

29/02/2008

Estrategias de Terapia Génica

<http://www.the-scientist.com/article/display/15447/>

Artículo publicado en la revista *The Scientist* sobre Terapia Génica y sus distintas modalidades.

29/02/2008

Cómo usar los virus en Terapia Génica

<http://www.dnfiles.org/home.html>

Serie dentro de los programas radiofónicos de *SoundVision
Productions*.

29/02/2008

Terapia Génica en humanos: Presente y futuro

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/hgn/v10n1/15wilson.shtml

Sitio en que se analiza el futuro de la Terapia Génica en la Medicina, elaborado por el Departamento de la Ciencia y la Energía de la Oficina de Biología y del Desarrollo dentro del Programa del Genoma Humano.

29/02/2008

Muerte de Jesse Gelsinger, en 1999, después de recibir un tratamiento de Terapia Génica

http://www.pbs.org/newshour/bb/health/jan-june00/gene_therapy_2-2.html

Sitio *NewsHour* de la Salud financiado por la *Fundación Robert Wood Johnson* en que se describe el caso de *Jesse Gelsinger* y el proceso seguido para esclarecer los acontecimientos.

29/02/2008

Animación de la inducción de genes en Terapia Génica

<http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/gin-e.htm>

Sitio creado por el Departamento de Pediatría Genética de la Universidad Médica de Tokio, que muestra animaciones sobre Terapia Génica.

29/02/2008

Animación de mutagénesis insercional como problema de la Terapia Génica

<http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/gpr-e.htm>

Sitio creado por el Departamento de Pediatría Genética de la Universidad Médica de Tokio, que muestra animaciones sobre Terapia Génica.

29/02/2008

Todos los enlaces sobre Terapia Génica y Celular de la FDA

<http://www.fda.gov/cber/gene.htm>

Sitio específico de la FDA sobre Terapia Génica y Celular en el que están disponibles innumerables enlaces directos relacionados con artículos y publicaciones, técnicas de "clonaje", Terapia Génica en humanos, congresos y presentaciones, aprobaciones de protocolos de Terapia Génica y Celular, usos potenciales, etc.

29/02/2008

Comisión de la FDA para la regulación de ensayos clínicos de Terapia Génica puestos en cuarentena

<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2003/ANS01202.html>

Discusión de la Comisión de Regulación de ensayos clínicos de Terapia Génica sobre los pasos a seguir en los casos de paralización de ensayos clínicos puestos en cuarentena.

29/02/2008

Puesta en cuarentena de algunos ensayos con vectores retrovirales

<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2003/ANS01190.html>

Puesta en cuarentena de algunos ensayos clínicos de Terapia Génica en los que se utilizan vectores retrovirales en células madre hematopoyéticas.

29/02/2008

Nuevas iniciativas para proteger a los participantes en ensayos clínicos

<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00717.html>

Discusión de nuevas medidas para asegurar la salud de aquellas personas, pacientes o voluntarios sanos, que participen en ensayos clínicos de Terapia Génica.

29/02/2008

El papel de la FDA en los ensayos clínicos de Terapia Génica en humanos

<http://www.fda.gov/cber/infosheets/genezn.htm>

Se describen las recomendaciones generales de la FDA en este sentido respecto a lo que se debe o no hacer, en cuanto a la seguridad de los participantes y respecto a los planes para el futuro.

Centro de Evaluación Biológica y de Investigación de la FDA

<http://www.fda.gov/cber/index.html>

Se describe el funcionamiento y cometidos generales y específicos del Centro de Evaluación Biológica y de Investigación de la FDA, sobre distintos aspectos relacionados con materiales biológicos y la investigación de protocolos de biotecnología, aplicables a la terapéutica en humanos.

29/02/2008

Lecciones y esperanzas en Terapia Génica

http://www.fda.gov/fdac/features/2000/500_gene.html

Artículo publicado en la revista *FDA Consumer Magazine*, en el que se discuten las lecciones que se deben aprender, a veces crudas, en Terapia Génica y las esperanzas de esta metodología.

29/02/2008

Trampas y promesas de la Terapia Génica

http://www.fda.gov/fdac/departs/2000/500_word.html

Artículo publicado en la revista *FDA Consumer Magazine* en que se habla de las falsas promesas de la Terapia Génica y de los fraudes que, por competencia entre los grupos de investigación en este tema puntero, pueden llevar a la muerte de un paciente.

29/02/2008

Fundamentos de la Terapia Génica desde la FDA

<http://www.fda.gov/fdac/features/2000/gene.html>

Sitio de la FDA en el que se describen de forma muy clara y general los aspectos generales de la Terapia Génica.

29/02/2008

Aspectos éticos de la Terapia Génica en humanos

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/hgn/v10n1/16walter.shtml

Artículo dentro del sitio elaborado por el Departamento de la Ciencia y la Energía de la Oficina de Biología y del Desarrollo dentro del Programa del Genoma Humano, en el que se tratan los aspectos bioéticos de la Terapia Génica cuando se aplica a enfermedades humanas haciendo mención a la falta de rigor científico de algunos grupos de investigación como ocurrió en el caso del fallecimiento de *Jesse Gelsinger*.

29/02/2008

Ética y Genética

<http://www.guardian.co.uk/genes/0,2759,395698,00.html>

Sitio del *Guardian Unlimited* en el que se trata de forma clara y específica el tema de la Bioética y la Genética, en general, y de la Terapia Génica en particular.

29/02/2008

Riesgos y Ética en Terapia Génica

<http://www.bmj.com/cgi/content/full/330/7482/79>

Artículo publicado en el *BMJ* en el que se tratan aspectos relativos a los recientes avances en Terapia Génica y a los riesgos y ética de esta estrategia terapéutica.

29/02/2008

Aspectos éticos de la Medicina Molecular

<http://www.cma.ca/multimedia/staticContent/HTML/N0/12/cjs/vol-47/issue-6/pdf/pg414.pdf>

Artículo publicado en la revista Canadian Journal of Surgery en que se analizan distintos aspectos éticos de la Medicina Molecular en sus diversas aplicaciones.

29/02/2008

*Base de datos pública
sobre ensayos clínicos del
Instituto Nacional de la
Salud de EEUU*

<http://clinicaltrials.gov/search/term=gene%2Btherapy>

29/02/2008

Base de datos de ensayos clínicos de la revista The Journal of Gene Medicine

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Base de datos mundial sobre ensayos clínicos de Terapia Génica que se publica en la revista *The Journal of Gene Medicine*, que a través de una búsqueda interactiva ("Interactive Database") se accede de una forma muy práctica a gráficos, estadísticas y resúmenes de los distintos ensayos clínicos.

Asociaciones científicas relacionadas con la Terapia Génica

Sociedad Americana de Terapia Génica

<http://www.asgt.org/>

Sociedad Australiana de Terapia Génica

<http://www.agts.org.au/>

Sociedad Europea de Terapia Génica y Celular

<http://www.esgt.org/>

Sociedad Española de Terapia Génica y Celular

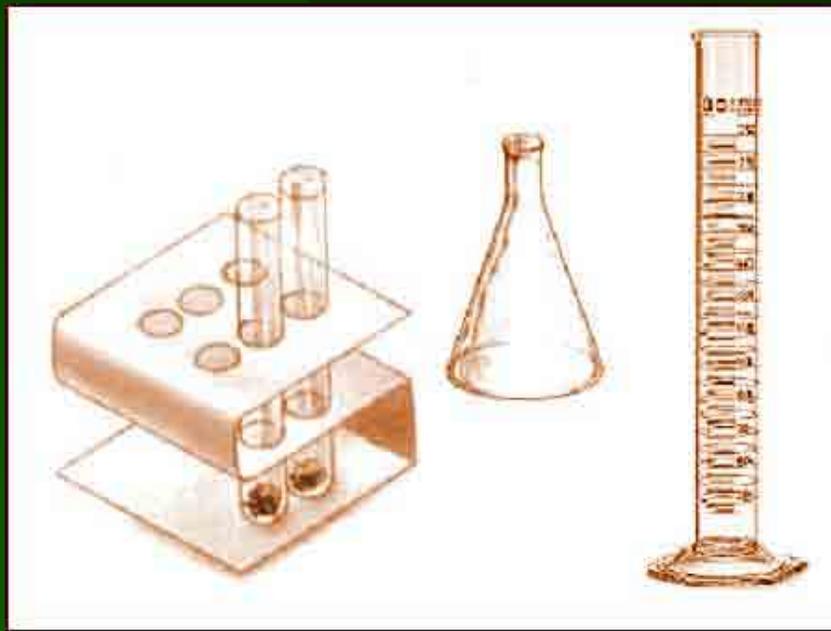
<http://www.setgyc.es/index.php>

TERAPIA GÉNICA

¿Memoria o Esperanza?

APÉNDICE II

“Estado del Arte” de
los Ensayos Clínicos de Terapia Génica



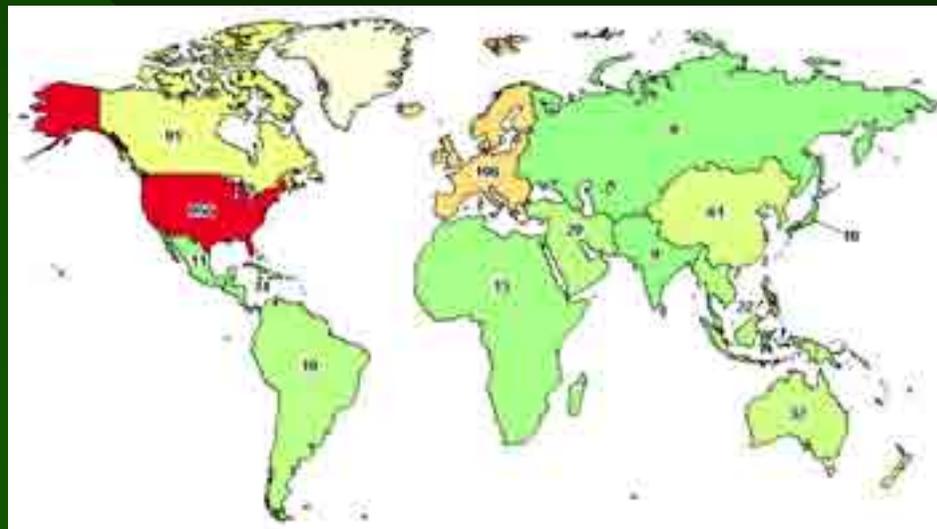
Antonio Liras

29/02/2008

Las estadísticas

Distribución mundial de los ensayos clínicos de Terapia Génica

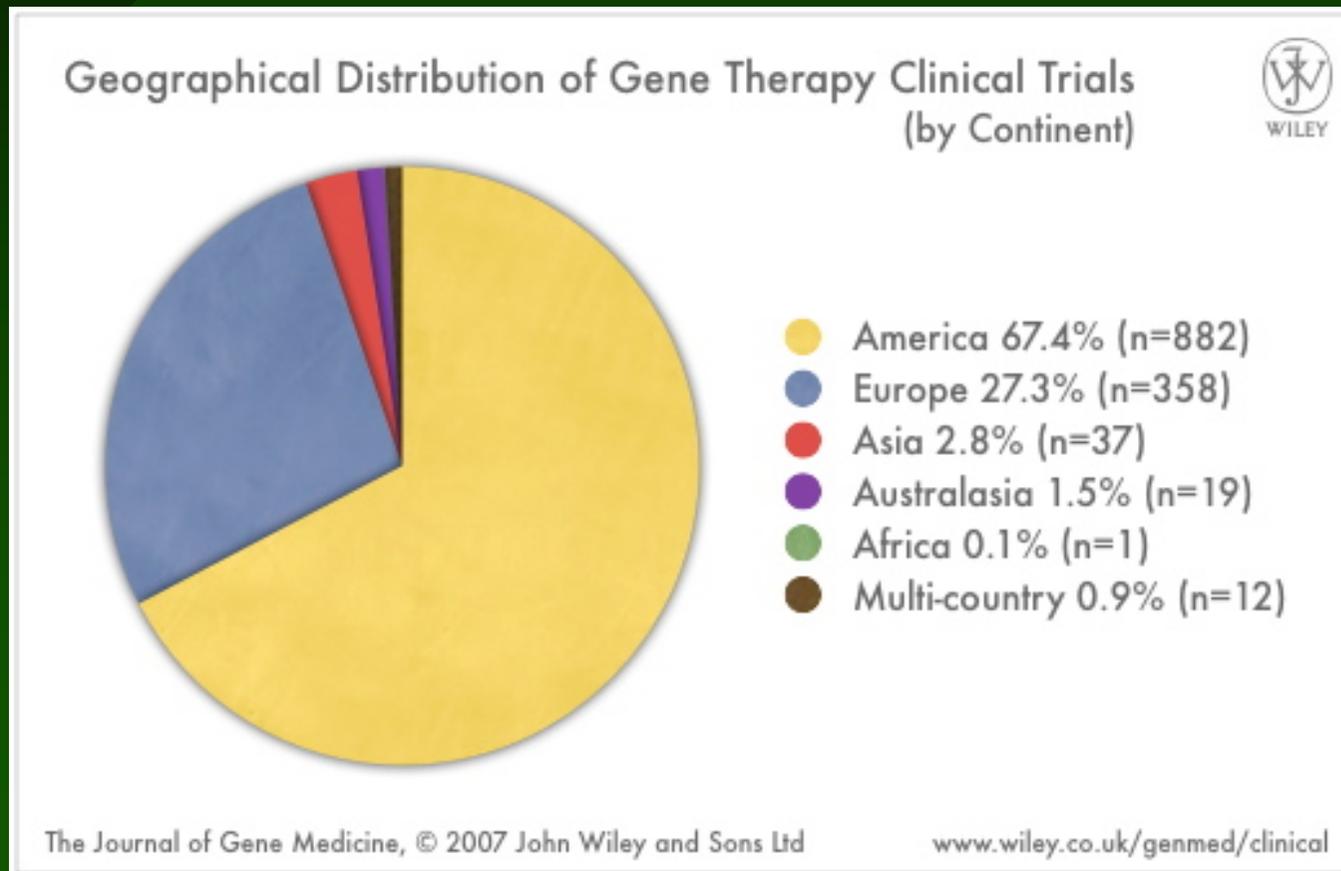
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=gene+therapy>



29/02/2008

Ensayos clínicos por continentes

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

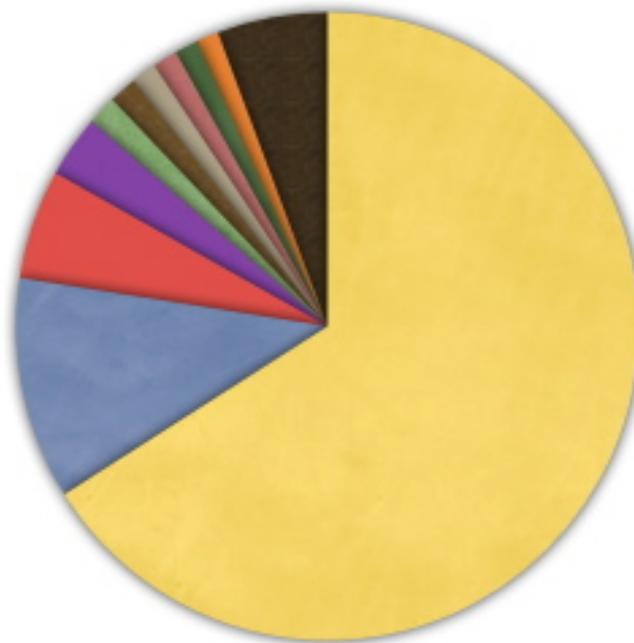


29/02/2008

Ensayos clínicos por países

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials
(by Country)

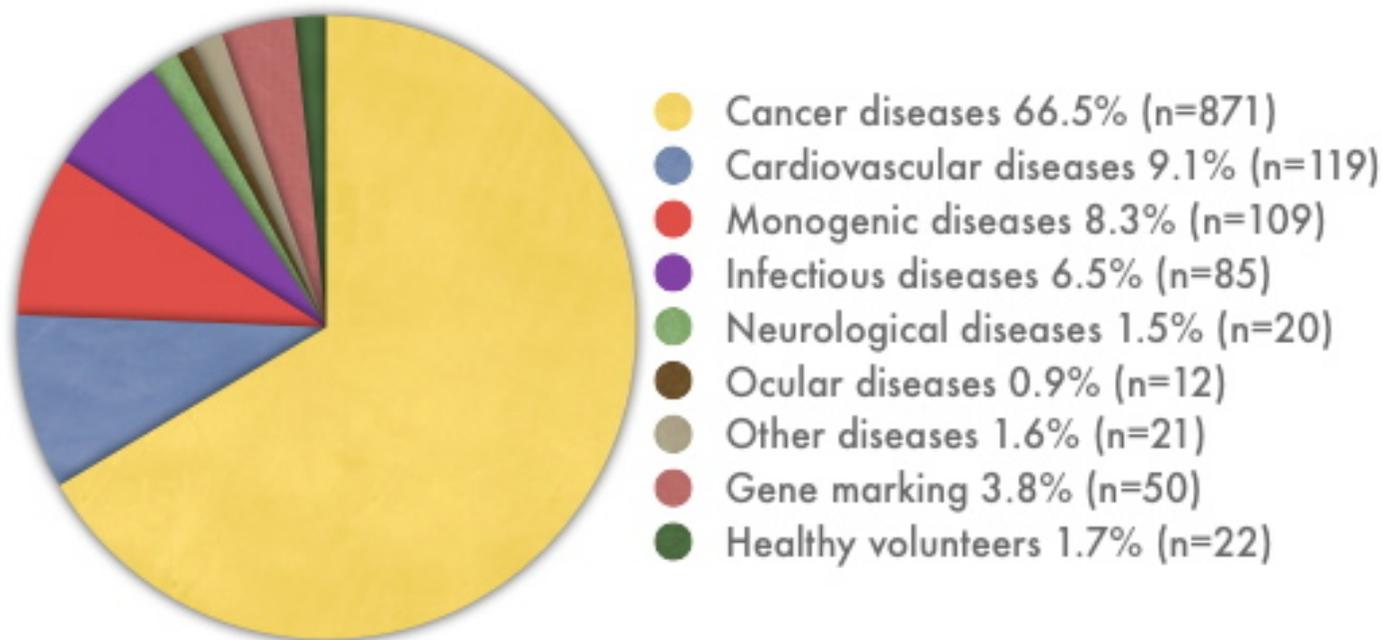


- USA 66% (n=864)
- UK 11.5% (n=150)
- Germany 5.7% (n=74)
- Switzerland 3.2% (n=42)
- France 1.5% (n=20)
- Belgium 1.5% (n=19)
- Australia 1.3% (n=17)
- Canada 1.3% (n=17)
- Japan 1.2% (n=16)
- Italy 1.1% (n=15)
- Other countries 5.7% (n=75)

Ensayos clínicos por tipo de enfermedad

<http://www.wiley.co.uk/genethrapy/clinical/>

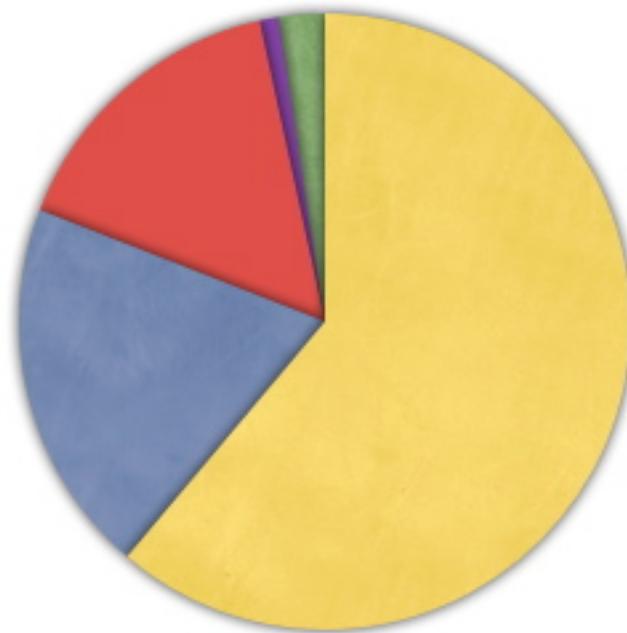
Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



Ensayos clínicos por la Fase de estudio

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Phases of Gene Therapy Clinical Trials



- Phase I 61.2% (n=801)
- Phase I/II 19.7% (n=258)
- Phase II 15.7% (n=205)
- Phase II/III 1% (n=13)
- Phase III 2.4% (n=32)

Ensayos clínicos por el tipo de estrategia de Terapia Génica

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials

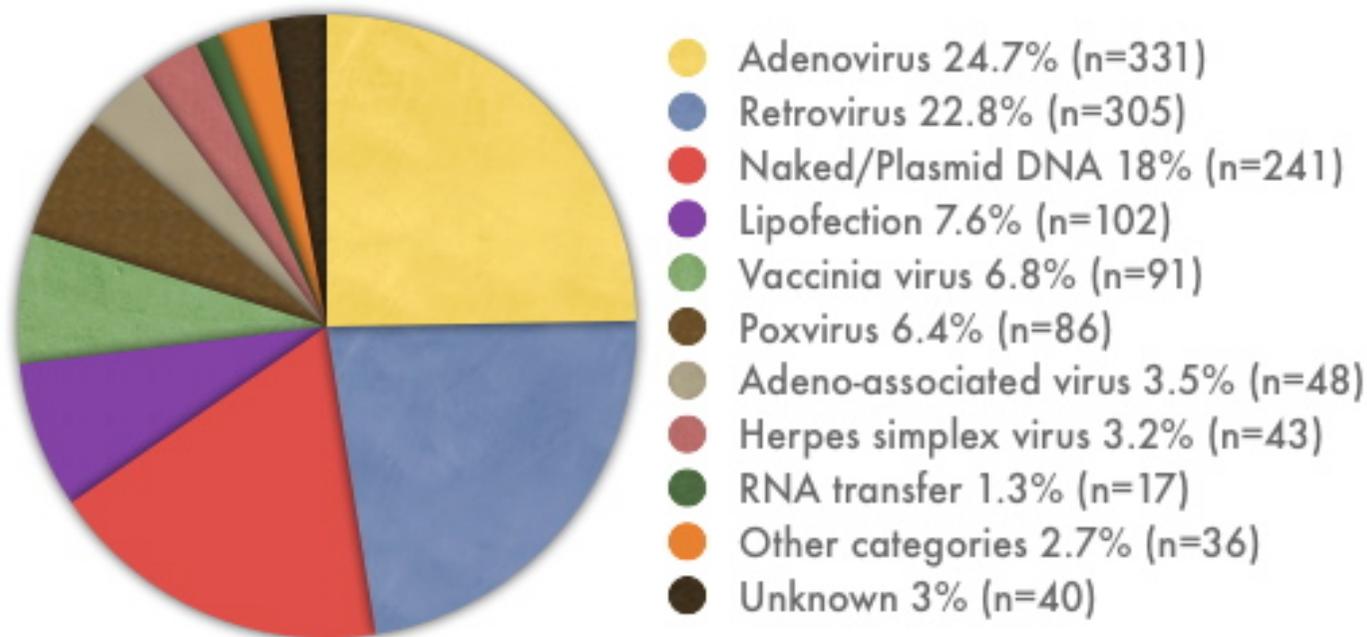


- Antigen 20.3% (n=266)
- Cytokine 18.9% (n=247)
- Tumor supressor 12% (n=157)
- Growth factor 8.2% (n=107)
- Suicide 8.2% (n=107)
- Deficiency 7.9% (n=103)
- Receptor 5.1% (n=67)
- Marker 4.1% (n=54)
- Replication inhibitor 3.7% (n=48)
- Other categories 8.6% (n=115)
- Unknown 2.9% (n=38)

Ensayos clínicos por el tipo de vector de transferencia

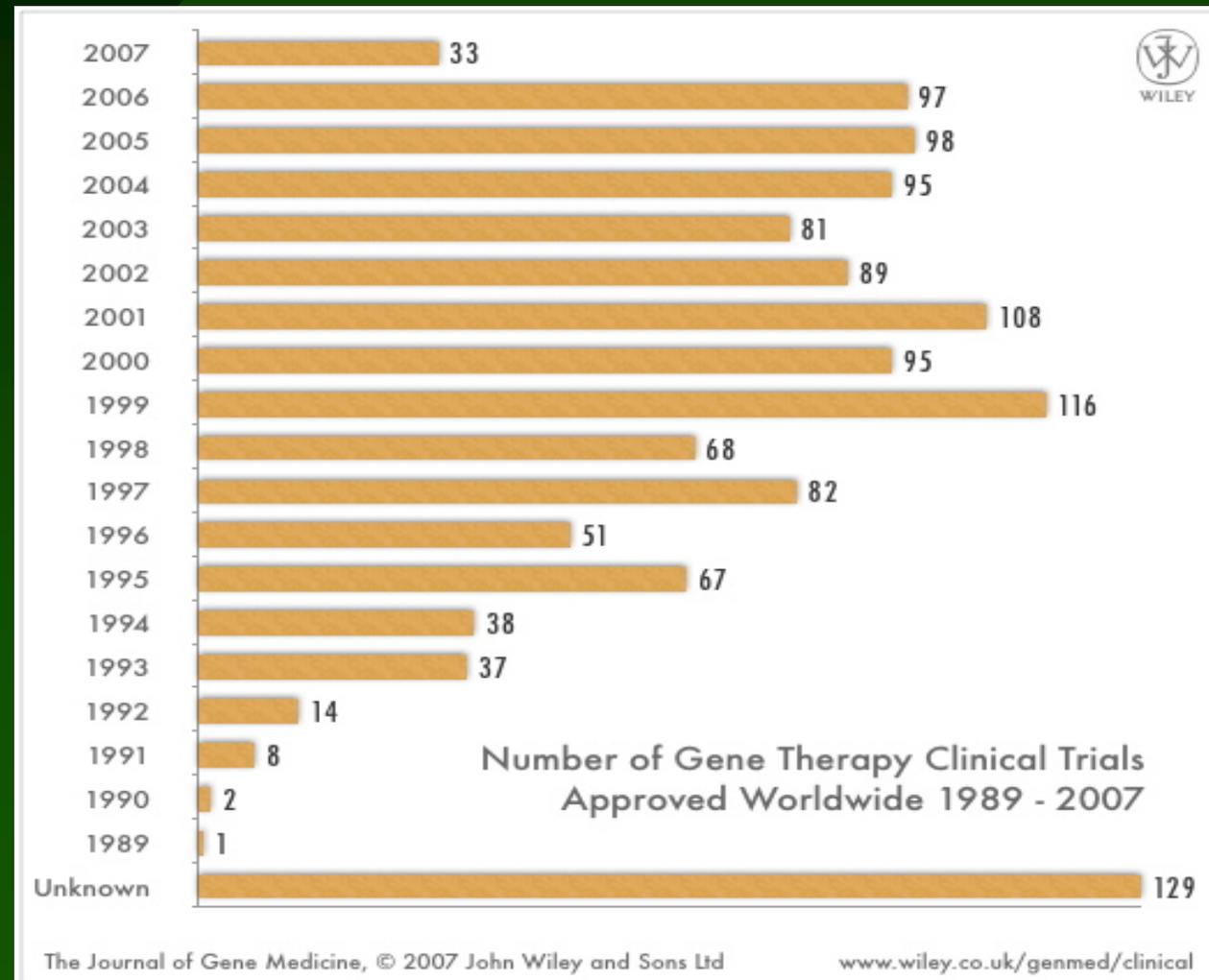
<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



Historia de los ensayos clínicos registrados

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>



29/02/2008

Listado y detalle de todos los ensayos clínicos registrados de Terapia Génica hasta la fecha indicada en esta presentación

<http://clinicaltrials.gov/ct/search?term=gene+therapy&submit=Search>

29/02/2008

Buscador
Gene Therapy and ... (Disease)

<http://clinicaltrials.gov/ct/screen/SimpleSearch>

29/02/2008

Revistas y publicaciones sobre Terapia Génica

Cancer Gene Therapy, de los editores de Nature

<http://www.nature.com/cgt/index.html>

Current Gene Therapy, de la Editorial Bentham Science

<http://www.bentham.org/cgt/index.htm>

Gene Therapy, de los editores de Nature

<http://www.nature.com/gt/index.html>

Human Gene Therapy, de la Editorial Mary Anne Liebert, Inc

http://www.liebertpub.com/publication.aspx?pub_id=19

Molecular Therapy, publicada por la Sociedad Americana de Terapia Génica

<http://www.nature.com/mt/index.html>

Vector, publicada por el Centro de Terapia Génica de la Universidad de Alabama

<http://www.uab.edu/genetherapy/vector.shtml>

29/02/2008