



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Terapia génica: estado actual y perspectivas

Gene therapy: current knowledge and perspectives

Autora: Silvia Cayón Somacarrera

Directora: Matxalen Llosa Blas

Santander, Junio 2017

ÍNDICE:

<u>Resumen</u>	2
<u>Abstract</u>	3
<u>Introducción</u>	4,5,6
<u>Tipos de terapia génica y sus aspectos éticos</u>	6-11
- Terapia génica somática vs Terapia génica germinal.....	6,7
- Terapia génica in vivo / ex vivo.....	7,8
- Terapia génica de mejoría.....	8,9
- Tipos de enfermedades abordables mediante la terapia génica.....	10,11
<u>Estrategias moleculares de modificación genética</u>	11-16
<u>Introducción de ADN en las células diana</u>	16-22
<u>Ensayos clínicos</u>	22-43
- SCID-ADA.....	22,23,24
- SCID-X1.....	24,25
- Hemofilia.....	26,27,28
- Amaurosis congénita de Leber.....	28-32
- Distrofia muscular de Duchenne y Becker.....	33,34,35
- Fibrosis quística.....	35,36,37
- Cáncer.....	37-41
- VIH.....	41,42,43
<u>Conclusiones y perspectivas</u>	44,45
<u>Bibliografía</u>	46-51

1- RESUMEN

El objetivo de la terapia génica es llevar a cabo modificaciones genéticas de las células del paciente con un fin terapéutico. Actualmente, la única modalidad de terapia génica en desarrollo es la dirigida a células somáticas, no germinales, lo que asegura que la transferencia sólo afecte al individuo en tratamiento y no a su descendencia. En este tipo de terapia las células a las cuales se dirige la terapia suelen ser aquellas involucradas en el proceso patogénico, sin embargo, en ciertas ocasiones, como por ejemplo en el cáncer, una de las estrategias que se están llevando a cabo es la modificación de células normales del sistema inmune del paciente para que lleven a cabo una potente respuesta inmune contra las células tumorales. Existen grandes esperanzas en el desarrollo de este tipo de terapia, tanto para enfermedades de origen genético que no tienen curación, como para el cáncer y enfermedades infecciosas. Sin embargo, hay también numerosas dificultades técnicas que no están del todo resueltas. Una de las claves del éxito de la terapia génica es la estrategia de modificación genética y el método de transferencia génica elegidos, que determinaremos según nuestros objetivos terapéuticos. Por otra parte, existe la necesidad de elaborar protocolos que deben ser rigurosamente analizados por comités de evaluación ética y científica, además de establecer un diálogo con el fin de evitar una presentación exitista de la técnica en el mercado sin mencionar sus dificultades inherentes.

Palabras clave: terapia génica, enfermedad genética, gen terapéutico, vector, CRISPR/Cas9.

2- ABSTRACT

The goal of gene therapy is to carry out genetic modifications of the patient's cells for a therapeutic purpose. The only mode of gene therapy currently under development is directed to somatic, non-germinal cells, which ensures that the modification only affects the individual being treated and not their offspring. In this type of therapy the cells to which the therapy is directed are usually those involved in the pathogenic process; however, in certain cases, such as in cancer, one of the strategies being carried out is the modification of normal cells of the patient's immune system to carry out a potent immune response against tumor cells. There is great hope in the development of this type of therapy, both for diseases of a genetic origin that have no cure, as well as for cancer and infectious diseases. But there are also numerous technical difficulties that are not entirely resolved. The key to the success of gene therapy is the method of gene transfer chosen, i.e the vector, which we will determine according to our therapeutic objectives. On the other hand, there is a need to elaborate protocols that must be rigorously analyzed by ethical and scientific evaluation committees, as well as establishing a dialogue in order to avoid a presentation of the technique based on unfounded optimism without mentioning its inherent difficulties.

Key words: gene therapy, genetic disease, therapeutic gene, vector, CRISPR/Cas9.

3- INTRODUCCIÓN

La terapia génica consiste en la utilización de un conjunto de técnicas que permiten la modificación genética de células con fines terapéuticos. Esto se consigue mediante la vehiculización de secuencias de ADN y ARN en el interior de las células diana, lo cual permite la modulación de la expresión de genes alterados, corrigiendo así el trastorno biológico que produce, o bien la modificación genética de las células afectadas para eliminarlas o paliar los síntomas de la enfermedad.^{1,2}

Desde la antigüedad la humanidad ha buscado distintas formas de combatir la enfermedad. La terapia génica se ha desarrollado como un método de acercamiento al tratamiento de las enfermedades humanas basado en la transferencia de material genético a las células de un individuo. Habitualmente la finalidad de esta transferencia de material genético es restablecer una función celular que estaba abolida o defectuosa, introducir una nueva función o bien interferir con una función existente. La única modalidad de terapia génica en desarrollo es la dirigida a células somáticas, no germinales, lo que asegura que la transferencia sólo afecte al individuo en tratamiento y no a su descendencia. Las distintas estrategias de la terapia génica se basan en la combinación de tres elementos clave, el material genético a transferir, el método de transferencia y el tipo celular que incorporará dicho material genético.³

La aprobación del primer protocolo clínico para un ensayo que implicaba la inserción de un gen en un ser humano fue realizada en enero de 1989. La solicitud fue presentada por los Dres. Anderson, Blaese y Rosenberg y no era propiamente una terapia génica¹². En septiembre de 1990, los mismos Blaese, Anderson y sus colaboradores realizaron el primer ensayo clínico de terapia génica con resultado exitoso. La paciente era una niña de 4 años con deficiencia en adenosina desaminasa, lo cual provoca una inmunodeficiencia combinada grave⁶. El error genético de sus linfocitos se corrigió *ex vivo* por transferencia génica y estos linfocitos ya corregidos se reinfundieron.⁷

A partir de este momento la terapia génica presentó un enorme desarrollo durante la década de los 90, con más de 400 ensayos clínicos en todo el mundo (Fig.1 y 2). Aunque inicialmente la atención se centró en el tratamiento de las enfermedades hereditarias monogénicas, posteriormente la mayor parte de los ensayos clínicos de terapia génica se enfocaron al tratamiento del cáncer.¹⁶

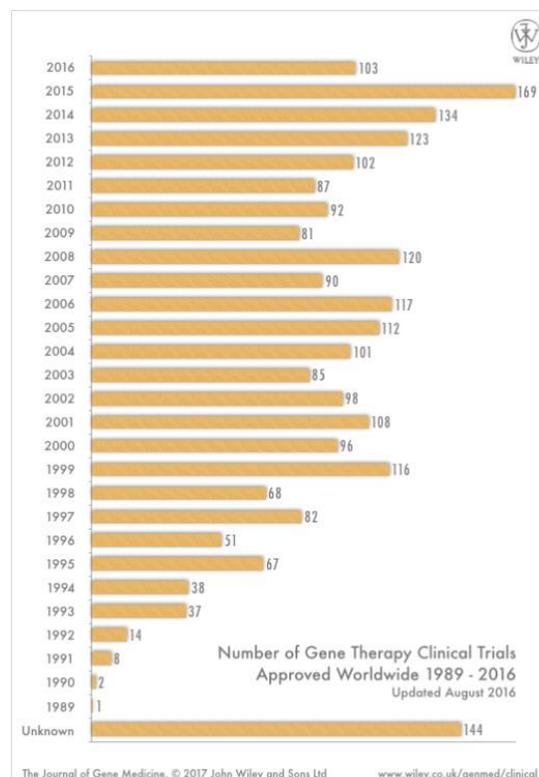
En general, los factores necesarios para conseguir que la terapia génica sea efectiva no son diferentes que para otras modalidades terapéuticas nuevas. Incluyen los factores técnicos (la distribución y expresión genética), clínicos (eficacia y seguridad terapéutica) y factores socioeconómicos. Se está realizando un enorme trabajo en la actualidad para mejorar la capacidad de los vectores para transducir células de forma

segura y específica, para aumentar la capacidad de regulación de la expresión del transgén por los promotores y para mejorar el conocimiento de las condiciones más adecuadas para la transferencia génica. Aun así, todavía es necesario un gran esfuerzo para conseguir el éxito final.³

La trágica muerte de un joven de 18 años que participaba en uno de estos ensayos clínicos supuso un duro golpe que generó alarma en todo el mundo. A finales de los 90 se produjo el primer éxito terapéutico: un grupo de niños con inmunodeficiencia combinada severa (causada por la mutación en el gen que codifica la cadena gamma común), fueron tratados en Francia mediante la transferencia *ex vivo* a células de su médula ósea de la versión correcta del gen alterado. Todos los pacientes mejoraron su capacidad inmune, lo que les permitió vivir en un ambiente normal. Poco después se observó que el éxito no había sido completo puesto que dos de estos niños desarrollaron leucemia aguda por la activación de un oncogén debido a la inserción aleatoria del material genético terapéutico en el genoma de las células corregidas.⁹

A pesar de todo esto, se había dado un paso definitivo: la terapia génica humana es factible y puede ser útil. Sin embargo, tenemos que tener en cuenta que los resultados de la terapia génica deben tener beneficios que pesen más que los riesgos y debe ofrecer ventajas sobre los tratamientos convencionales, sólo así puede llegar a ser aceptada en la práctica médica general.³

Figura 1. Número de ensayos clínicos aprobados desde el año 1989 al 2016.¹⁰



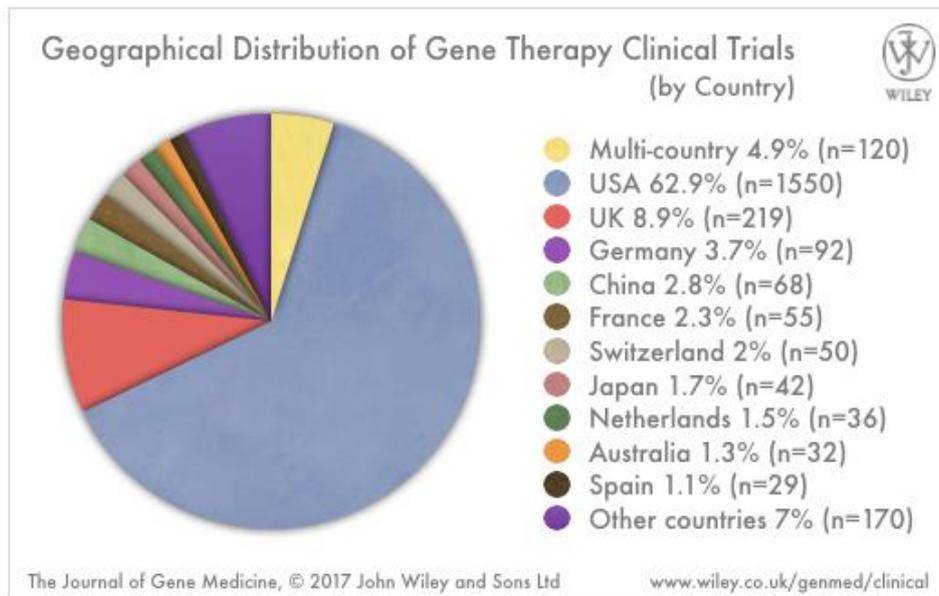


Figura 2. Distribución geográfica por países de la realización de ensayos clínicos.¹⁰

4- TIPOS DE TERAPIA GÉNICA Y SUS ASPECTOS ÉTICOS

4.1. Terapia génica somática vs Terapia génica germinal

La terapia génica podríamos clasificarla en primer lugar según el tipo de célula en el que está siendo aplicada. Por tanto podemos dividirla en terapia génica somática y terapia génica germinal.

La terapia génica germinal consiste en la inserción de un gen terapéutico en las células sexuales femeninas o masculinas, es decir, en los óvulos o en los espermatozoides, lo que va a determinar un cambio en su dotación genética que va a ser transmitido a los descendientes. Este tipo de terapia génica no se ha realizado en humanos ya que está prohibida por la legislación actual. Esta prohibición es debida al peligro que supone modificar el acervo genético de la especie humana, con consecuencias imposibles de prever. La posibilidad de daño pone al principio de no maleficencia por encima del de beneficencia, debido al riesgo para las generaciones futuras, por lo que de momento no se están llevando a cabo ensayos clínicos en este campo.^{1,2,22}

Todos los ensayos de terapia génica llevados a cabo hasta la fecha han sido realizados sobre células somáticas. Este tipo de terapia génica, denominada terapia génica somática, tiene como característica principal que no se transmite a la descendencia, ya que no manipulamos la línea germinal. Como consecuencia de esto, en principio, no supone ningún problema ético, siempre y cuando su fin sea

terapéutico y no eugenésico. Sin embargo, hay quienes opinan que la manipulación genética per se no es ética.

4.2. Terapia génica *in vivo* / *ex vivo*

En cuanto a la terapia génica somática podemos realizar una subdivisión basada en el lugar donde se produzca la manipulación genética de las células. Así podemos llevar a cabo terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Mediante la terapia *in vivo*, introducimos un gen terapéutico en la célula diana, como por ejemplo la modificación de células pulmonares o hepáticas con una versión correcta del gen de la alfa-1 antitripsina en pacientes con enfisema pulmonar o cirrosis, o la introducción del gen de la distrofina en tejidos musculares de pacientes con distrofia muscular. La gran ventaja de las técnicas *in vivo* es su mayor sencillez. Sin embargo, tienen el inconveniente de que el grado de control sobre todo el proceso de transferencia y la eficiencia global es menor, además de que es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular.^{1,2}

Mediante la terapia *ex vivo*, realizamos la manipulación genética fuera del organismo, es decir, extraemos las células del paciente, las cultivamos en el laboratorio, les introducimos el gen terapéutico y se las reinfundimos al paciente. Este método ha sido útil por ejemplo para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada severa (SCID) por deficiencia de ADA. El método de introducción del gen terapéutico depende tanto de la célula diana como del objetivo de dicha terapia, pero tenemos que tener en cuenta que los métodos que permiten la transferencia génica presentan problemas aún en vías de resolución. Las ventajas que presenta este tipo de técnica son la capacidad para elegir el tipo de célula a tratar, la posibilidad de mantener el control de todo el proceso, y como consecuencia, la consecución de una transducción genética más eficaz. En cuanto a inconvenientes, cabría destacar su mayor complejidad y coste, además de la incapacidad de transducción de tejidos que no crezcan en cultivo y la presencia de riesgo de contaminación en el proceso de manipulación de las células.^{1,2}

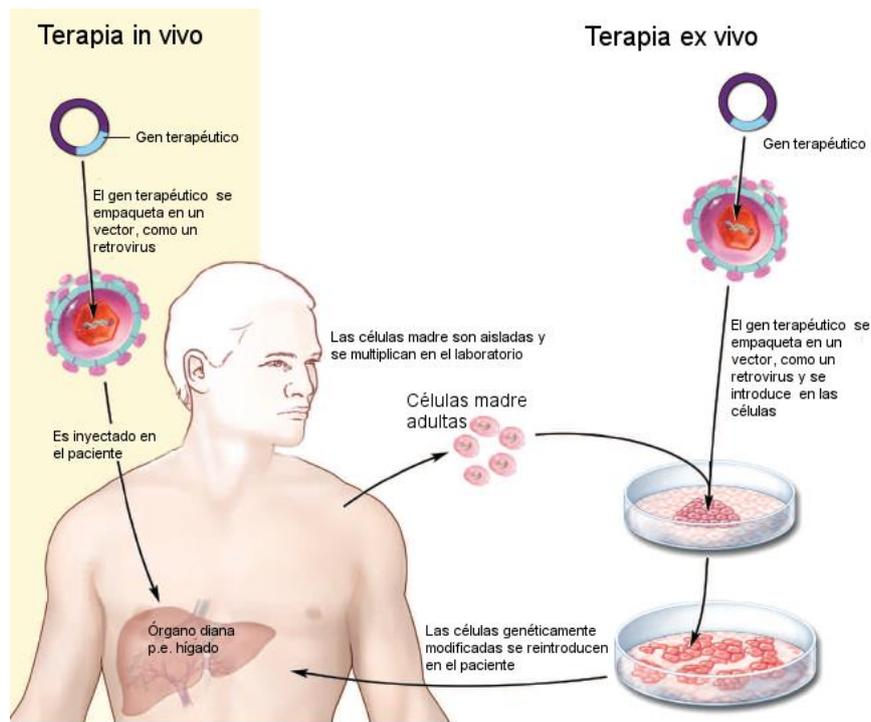


Figura 3. Diferencias entre la terapia *in vivo* y la terapia *ex vivo*.¹¹

4.3. Terapia génica de mejoría:

La terapia génica, por definición, es una técnica que tiene como fin la mejora de la salud, es decir, tiene un fin terapéutico. Esto se contrapone al concepto de terapia génica de mejoría, que tiene como propósito la mejora de la especie gracias a la utilización de modificaciones genéticas. Por ello parece más correcto la utilización del término “usos no terapéuticos de la tecnología de terapia génica” ya que no lo incluiría dentro de lo que realmente consideramos como “terapia”. Las posibles aplicaciones en mejoría no deberían estar contempladas dentro de este trabajo, sin embargo, técnicamente son igualmente posibles y de hecho, se están llevando a cabo. Un ejemplo de ello son los trabajos llevados a cabo por la compañía biotecnológica BioViva que comentaremos más adelante.

El genoma humano es patrimonio de toda la humanidad, declarado por la UNESCO en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997), por ello la aceptación del uso de la terapia génica como técnica para la mejora genética lo único que conseguiría sería la creación de una nueva forma de discriminación, la discriminación genética. Es de interés global promover una normativa internacional que limite la posibilidad de la manipulación genética. El propósito de regular a nivel internacional es evitar el incremento de las diferencias sociales entre países, ya que en caso de que la normativa fuese más permisiva en unos países que en otros, existiría el peligro de que la mejora genética sólo estuviese al alcance de los más pudientes, lo que incrementaría aún más las diferencias entre países y clases sociales. Por todo ello no se justifica la mejoría genética, porque además de todos estos problemas éticos, también presentaría los mismos problemas

que encontramos a la hora de aplicar la terapia génica somática utilizada para tratar enfermedades.^{12,55}

Un ejemplo representativo de esto, es el caso de la compañía biotecnológica BioViva que trabaja para desarrollar tratamientos para retrasar el proceso de envejecimiento. Esto ilustra muy bien cuando lo científico pasa a ser mediático y nos hace reflexionar sobre cuál es el límite entre lo que es curar una enfermedad o mejorar la especie, ya que el envejecimiento no es una enfermedad.

En abril de 2016, la compañía reveló que su propia directora ejecutiva, Elizabeth Parrish, había sido sometida a la primera terapia génica eficaz contra el envejecimiento humano. El tratamiento, afirmó, había invertido la edad biológica de sus células inmunes en 20 años. En septiembre de 2015, Parrish, entonces de 44 años, viajó a Colombia para recibir dos terapias genéticas experimentales. Uno era un inhibidor de la miostatina, una droga que se está probando como un tratamiento para la pérdida del músculo. La otra era una terapia génica de la telomerasa, el fármaco que BioViva afirma que ha invertido la edad biológica de sus células al alargar partes de su material genético llamado telómeros.

El tratamiento es muy controvertido ya que BioViva no había hecho el trabajo preclínico necesario para progresar a los estudios en humanos. De hecho, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos no autorizó el experimento de Parrish, de ahí su viaje a una clínica en Colombia. BioViva afirma que seis meses después del tratamiento, los telómeros en los glóbulos blancos de Parrish se habían alargado en un 9%. Esto fue un anuncio que recibió una mezcla de burla e incredulidad de muchos científicos, que citaron la falta de procedimiento científico apropiado. Parrish y su equipo dicen que planean explorar los efectos de la terapia génica en otras células de su cuerpo y evaluar el efecto del tratamiento de pérdida de músculo. Mientras tanto, buscan probar los tratamientos en más personas, pero primero necesitan encontrar un país con requisitos menos estrictos que los Estados Unidos.

Duncan Baird, profesor de Cáncer y Genética en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cardiff afirmó que sin una comprensión mayor de los procesos biológicos que subyacen en el envejecimiento, tal manipulación podía ser peligrosa. Precisamente los telómeros tienen una función vital en la limitación del número de veces que una célula puede proliferar, por lo tanto limita su potencial cancerígeno. Por esto, la intromisión en un mecanismo tan importante de supresión tumoral no parece una idea particularmente buena.¹³

4.4. Tipos de enfermedades abordables mediante la terapia génica

Las enfermedades a las que se puede aplicar esta técnica las podemos distinguir según categorías:¹²

- 1) **Enfermedades monogénicas** originadas por mutaciones en un solo gen y con un patrón de herencia mendeliano. Estas mutaciones son responsables de un gran número de enfermedades crónicas, como por ejemplo, las hemofilias, la anemia falciforme, la inmunodeficiencia por déficit de adenosina desaminasa, la hipercolesterolemia familiar y la fibrosis quística.
- 2) **Enfermedades multifactoriales**, constituidas por aquellas en las que hay alteraciones en varios genes. El ejemplo más importante dentro de este grupo sería el cáncer. Otros ejemplos incluirían la hipertensión arterial y la diabetes mellitus.
- 3) **Enfermedades neurológicas degenerativas**, como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer.
- 4) **Enfermedades infecciosas**, como el herpes, la hepatitis o el VIH.
- 5) **Trasplante de órganos**. Se pueden introducir genes para antígenos del donante en el huésped, que hagan que este tolere inmunológicamente al órgano donante cuando sea trasplantado.

La terapia génica somática sobre todo ha sido utilizada para el tratamiento de defectos genéticos en enfermedades monogénicas. Las enfermedades poligénicas son más complejas de abordar y de momento se desestima su uso como posible vía terapéutica basada en la corrección genética. Sin embargo, hay una creciente implantación de estrategias encaminadas a modificar las células afectadas para conseguir paliar los síntomas de la enfermedad. Un caso particular es el cáncer ya que aunque esté basado en la presencia de numerosos defectos genéticos, todos tienen los mismos mecanismos de enfermedad, la proliferación celular descontrolada y la ausencia de apoptosis, sobre los que se pretende actuar.^{1,2}

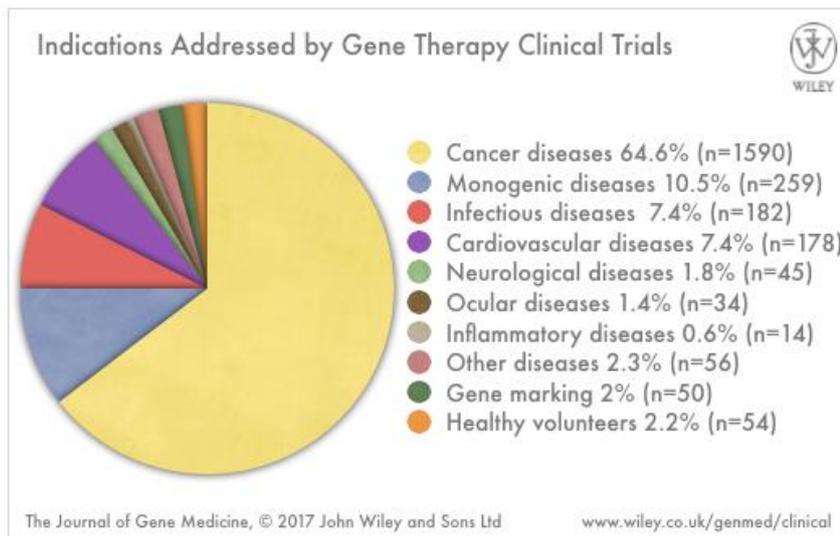


Figura 4. Tipos de enfermedades en las que se están realizando ensayos clínicos actualmente. En la figura podemos ver reflejado el protagonismo que ha adquirido la terapia génica en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades complejas, frente a un 10% de ensayos clínicos dirigidos a tratar enfermedades monogénicas¹⁰

5- ESTRATEGIAS MOLECULARES DE MODIFICACIÓN GENÉTICA:

Lo primero que hay que establecer para llevar a cabo un ensayo de terapia génica es el ADN que queremos introducir en las células, el cual lo determinaremos según nuestro objetivo terapéutico.

Los genes están formados por diferentes partes, las zonas no codificantes, que serían los intrones, y las codificantes, que serían lo que denominamos exones, las cuales son las partes que llevan la información para la fabricación de la proteína. Además delante de cada gen existe una secuencia específica de cada uno de ellos denominada región promotora o promotor. Dicha región es la encargada de la regulación de la expresión del gen al que acompaña, es decir, es la que decide en qué célula y en qué momento es necesaria la producción de la proteína codificada por el gen. En los últimos años hemos determinado la secuencia de muchos genes; sin embargo, la identificación funcional es más difícil. Por ello se han desarrollado una serie de estrategias que nos pueden ayudar. Una de ellas sería la generación de un ratón *knockout*, que consiste en la desactivación de ese gen específico y posterior evaluación de los síntomas que padece el ratón. La otra estrategia que ha conseguido dilucidar la mayor parte de las funciones de los genes y como consecuencia el papel fisiológico de las proteínas producidas a partir de ellos, consiste en la comparación del gen del individuo enfermo con el del individuo sano. Su función se infiere del defecto fisiológico que los enfermos padezcan. En cuanto a la funcionalidad de los genes, tenemos que tener en cuenta que todas las células presentan los mismos genes en sus cromosomas, sin embargo lo que hace que cada tipo celular sea diferente es su contenido en proteínas. Esto quiere decir que no todos los genes en todas las células

se expresan de igual forma, lo que nos permite inferir la importancia de la correcta función de cada gen y la correcta síntesis de proteínas a partir de cada uno de ellos.

Normalmente en el contexto de la terapia génica se utiliza una copia en ADN (cADN) del mARN de la proteína, que se colocará tras una región promotora. Esta región promotora comenzará a transcribir gracias a la acción de los factores de transcripción específicos de la célula en la que se ha introducido, es decir, debemos seleccionar cuidadosamente el promotor que vamos a utilizar para que el gen que introducimos se exprese solamente en el sitio y momento adecuado.¹

La estrategia a seguir será distinta en el caso de que se quiera contrarrestar una mutación, como es el caso de la terapia génica de enfermedades monogénicas, o hacer algún otro tipo de modificación genética en las células para tratar una enfermedad multifactorial o adquirida.

En el caso de enfermedades monogénicas, la estrategia a seguir dependerá del efecto del gen mutado; es decir, este gen puede estar haciendo que una proteína deje de fabricarse o tenga una escasa o nula función (mutaciones de pérdida de función), o bien que la proteína se fabrique con una función excesiva o alterada (mutaciones de ganancia de función).¹⁴

➤ **La proteína deja de fabricarse o lo hace con una función deficiente:**

En este caso lo que intentamos es introducir el gen terapéutico normal que produzca un aporte continuo y correcto de proteínas al tejido afecto (Terapia génica de aumento génico) (Fig. 5A). Al principio se consideraba que para que la terapia génica funcionase, el gen terapéutico debía colocarse en el lugar exacto en el que está el gen defectuoso. Sin embargo, ahora sabemos que no es así, ya que el gen introducido puede producir su proteína y por tanto corregir el defecto genético desde otras localizaciones, tanto dentro como fuera del cromosoma (episomas, minicromosomas autónomos).^{1,14}

➤ **La proteína se expresa excesivamente o de manera alterada**

En este caso, no basta con introducir una copia del gen salvaje; hay que silenciar la expresión del alelo mutado. Esta estrategia puede llevarse a cabo de diferentes formas (Fig. 5B y 5C):

- 1) Silenciando la expresión génica, evitando así la fabricación de dicha proteína.
- 2) Sustituyendo la copia del gen mutado por una copia silvestre.
- 3) Introduciendo un alelo antimorfo que contrarreste el efecto del producto anómalo.

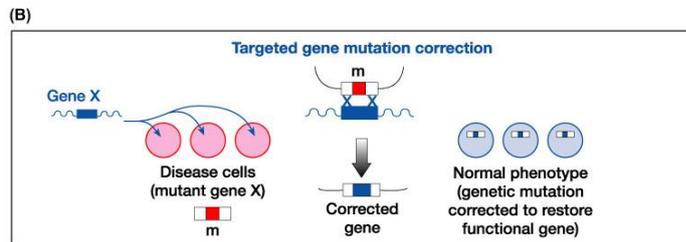
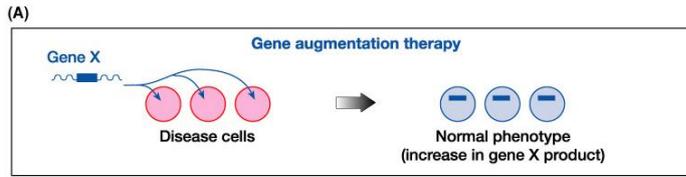
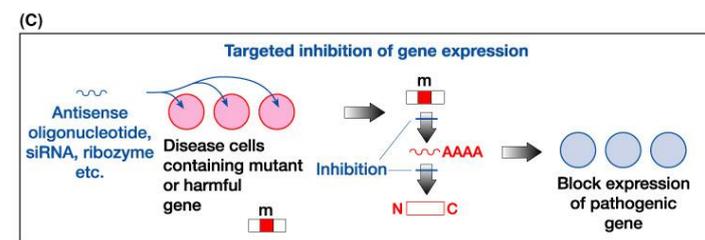


Figura 5. Mecanismo de modificación genética en enfermedades monogénicas.⁶

Figure 21-4 part 1 of 3 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)



En el caso de terapia génica dirigida hacia enfermedades multifactoriales o adquiridas, las estrategias no pretenden corregir una mutación, sino modificar genéticamente la célula afectada para poder paliar los síntomas. Las estrategias en este caso son muy variadas. Algunas de las tendencias más generales serían las siguientes:

1) Provocar la muerte de la célula que contiene el gen mutado:

Este enfoque es particularmente aplicable al tratamiento del cáncer ya que para destruir las células tumorales podremos introducir genes tóxicos o activadores de profármacos, o utilizar la inmunoterapia génica, como veremos más adelante (Fig. 6).¹⁴

2) Silenciamiento génico o introducción de alelos antimorfos:

En enfermedades infecciosas tenemos como objetivo bloquear las funciones esenciales del patógeno para que no pueda actuar, por lo que se utilizarán estrategias de silenciamiento génico o alelos antimorfos dirigidos hacia funciones necesarias para el ciclo vital del patógeno. Esta estrategia será comentada más a fondo en el apartado de ensayos clínicos para el VIH.¹⁴

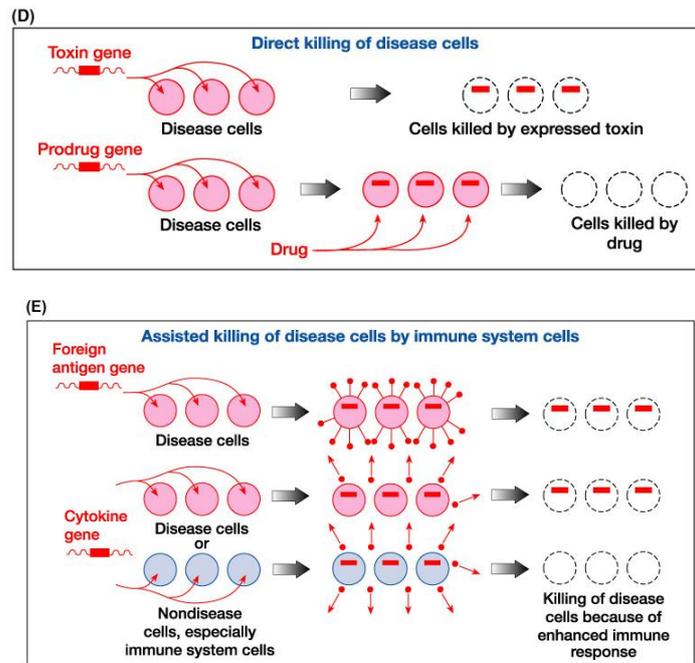


Figura 6. Mecanismo de modificación genética en enfermedades multifactoriales.⁶

3) Nuevas estrategias:

En enfermedades de herencia compleja, están surgiendo nuevas estrategias encaminadas a paliar los síntomas principales de la enfermedad, independientemente de su causa genética. Este tipo de estrategias están todavía poco implementadas, pero seguramente en el futuro veremos grandes avances, ya que se dirigen hacia enfermedades de alta prevalencia en la población.

Un ejemplo puede ser un reciente ensayo clínico de terapia génica de la enfermedad de Parkinson. En marzo de 2011, los medios de comunicación se hicieron eco de un procedimiento llevado a cabo por el Dr. Michael Kaplitt y neurocientíficos del Colegio Médico Weill Cornell de Nueva York. Dicho procedimiento se denominó NLX-P101 y consistió en la inyección de un virus que contenía un gen que aumentaba la producción de GABA, en las neuronas del cerebro de personas con la enfermedad de Parkinson. Tras 6 meses de la realización de la intervención se analizó la evolución de las personas que se sometieron al procedimiento y los resultados reflejaron una mejoría del 23.1 % en las funciones motoras de los pacientes tratados en comparación con el grupo control. En aquel momento aunque la comunidad científica se mostró esperanzada varias voces se alzaron pidiendo cautela ya que el procedimiento se había realizado en muy pocos pacientes y había que esperar a que el tiempo contestara las dudas sobre la seguridad de introducir un virus en el cerebro de una persona.

Ante esto, cuatro años después el Dr. Michael Kaplitt sigue considerando los resultados muy alentadores ya que la evolución de los pacientes tratados sigue siendo favorable y sin ningún efecto secundario. A la vista de los buenos resultados, podríamos considerar a este tipo de terapia génica una alternativa de futuro real a la estimulación cerebral profunda.¹⁵

Independientemente del tipo de estrategia elegido, el problema a abordar es el de la modificación genética per se. Una vez introducido el gen de interés en la célula, ¿cuál es el destino de ese ADN? ¿qué requerimientos hay para que funcione? La terapia génica de aumento génico en principio solo necesita la expresión del gen introducido, independientemente de que el gen introducido se inserte en cualquier sitio del genoma receptor, o incluso se mantenga de manera episomal. En cambio, las estrategias de silenciamiento génico requieren estrategias más elaboradas que han sufrido grandes avances en los últimos años gracias a dos tipos de técnicas:

➤ Introducción de ARN de interferencia para silenciar una función génica.

La estrategia se basa en el fenómeno de silenciamiento postranscripcional que tiene como protagonista al ARNi, que consiste en un fragmento de ARN de doble cadena de 21 nucleótidos. El proceso llevado a cabo por el ARNi es un proceso muy específico que actúa selectivamente sobre el ARN para el que es exactamente complementario (Fig. 7). La presencia de este ARN de doble cadena intracelular activa una endonucleasa denominada DICER que corta el ARN de doble cadena en fragmentos de 21-23 nucleótidos (ARNpi o de pequeña interferencia). A continuación los fragmentos de ARNpi forman un complejo con una serie de nucleasas y helicasas denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). Durante el ensamblaje de RISC, una de las hebras formará parte del complejo y otra actuará como guía para que RISC se una al ARNm homólogo y catalice el corte de la secuencia, llevado a cabo por una ARNasa diferente de DICER. Tras esto, los fragmentos de ARN son degradados por exonucleasas celulares, completando así el proceso de silenciamiento.

Alguna de las desventajas que presenta este proceso es la extraordinaria especificidad necesaria entre el ARNi y el ARNm homólogo, que exige una casi perfecta homología entre los 21- 23 nucleótidos. Por ejemplo, Gitlin *et al* trabajando con un modelo de ARNi para poliovirus, detectó una variante que escapaba al mecanismo de interferencia y se dio cuenta que esto se debía a la presencia de una única sustitución en el ARNi.¹⁶

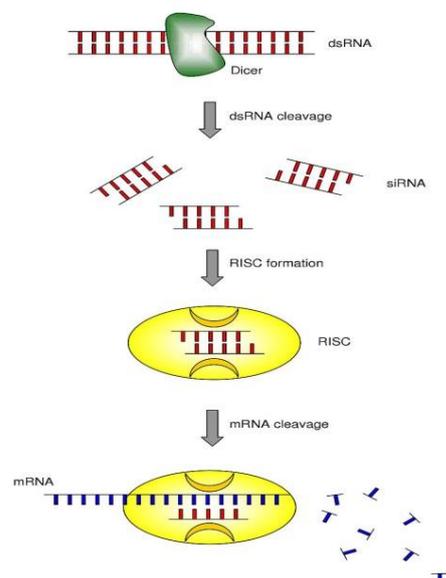


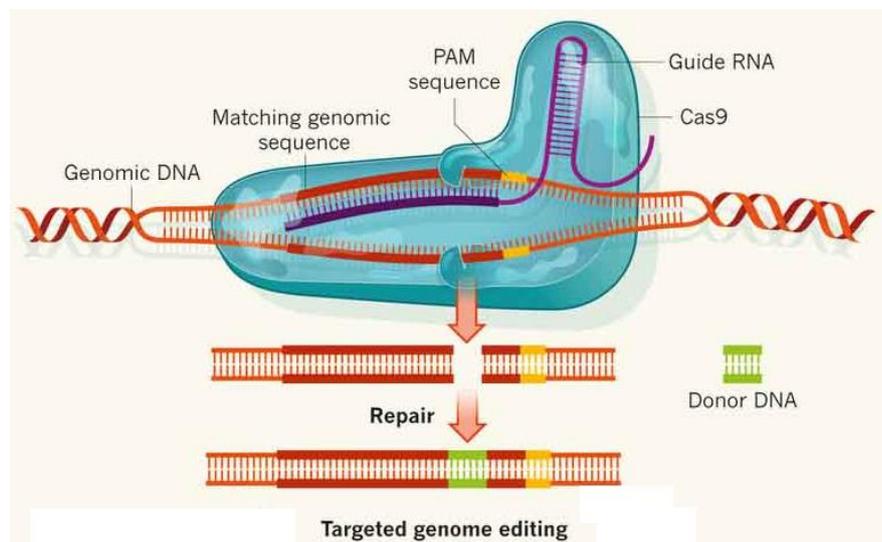
Figura 7. Mecanismo de acción del ARNi¹⁷

➤ Sistema CRISPR/Cas9:

Representa un sistema de edición genética sitio-específica que ha revolucionado el campo, por la facilidad con la que permite generar modificaciones genéticas en sitios concretos del genoma. El sistema CRISPR/Cas9 constituye un sistema inmune procariótico que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos y provee una forma de inmunidad adquirida. Cuando la bacteria detecta el ADN del virus, fabrica una secuencia complementaria de ARN que se empareja con la secuencia ADN introducida por el virus y guía a la proteína llamada Cas9 para formar un complejo. Cas9 es una enzima con actividad nucleasa, por lo que se producirá una escisión en el ADN una vez se haya producido la unión de las secuencias complementarias (Fig.8).

En los últimos años, los científicos se han dado cuenta que este sistema no sólo sirve para cortar ADN viral sino que sirve para cortar cualquier secuencia de ADN que necesitemos, simplemente cambiando el ARN guía. Por ello, podremos eliminar genes defectuosos y tras esto, introducir genes terapéuticos en su lugar. Una de las muchas ventajas que tiene este sistema es que puede actuar sobre diferentes genes a la vez por lo que parece ser una buena opción en el tratamiento de enfermedades más complejas en las que no sólo está presente la mutación de un gen.^{18,19}

Figura 8. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9²⁰



6- INTRODUCCIÓN DEL ADN EN LAS CÉLULAS DIANA

Los mayores problemas que podemos encontrar a la hora de llevar a cabo un ensayo de terapia génica, están centrados en los vectores que vamos a utilizar. Los vectores deben tener la capacidad de transportar el gen terapéutico de forma segura y eficaz, además de hacerlo de forma específica a las células diana. El vector es una de las claves del éxito de la terapia génica, por ello el diseño de nuevos vectores es uno de los grandes desafíos en este campo.

a) **Vectores basados en virus:** Algunos virus humanos con especificidad para determinadas células han sido usados como vectores tras reemplazar algún fragmento génico que confiere virulencia al virus, por el gen terapéutico.

Se han utilizado como vectores distintos tipos de virus atendiendo a determinadas características con respecto a su tropismo, inmunogenicidad, capacidad de carga o ciclo integrativo, que les hacen más o menos adecuados según la estrategia a seguir.^{1,14}

– Retrovirus:

Una característica relevante de los retrovirus es que se integran en el cromosoma de la célula huésped como parte de su ciclo vital. La introducción de los genes terapéuticos permanecerá de forma permanente en las células infectadas, ya que una vez se integra en el cromosoma, estos genes serán transferidos a las células descendientes. Además, los retrovirus solo infectan células en división, por lo tanto es una opción muy interesante en el caso de introducción de genes en células madre o cualquier célula que tengamos en cultivo.

Sin embargo, presentan varios problemas. En primer lugar, son inútiles en el caso de querer llevar a cabo correcciones genéticas en células que no se dividen o lo hacen poco como son la mayoría de células diferenciadas del organismo, lo que limita su uso *in vivo*¹. En segundo lugar, conllevan un cierto riesgo intrínseco de mutagénesis por inserción, ya que no podemos controlar donde se integran, por lo que podrían alterar lugares tan importantes como los genes de control de la división celular, reparación del ADN o programación de la apoptosis. De hecho, se ha determinado que los retrovirus se insertan preferentemente en sitios activos de transcripción, lo que aumenta el peligro de que su inserción active un gen oncogénico.¹⁴ En tercer lugar, los retrovirus son generalmente inactivados en sangre por el complemento, por lo que sólo se pueden usar *ex vivo*.¹⁴ Así mismo, otro de los inconvenientes que presentan este tipo de vectores son su limitada capacidad de carga, tan sólo 7 kb.

Como excepción a los dos primeros inconvenientes, se encuentran los lentivirus, que son un tipo de retrovirus que, a diferencia de los gammaretrovirus, pueden infectar tanto células en división como células que no se dividen. Además, los lentivirus no han demostrado asociación con la oncogénesis aún. Esto puede ser debido a la mejora del diseño de los vectores o a diferencias en los lugares de inserción entre los gammaretrovirus y los lentivirus.²¹

Se han llevado a cabo estudios en los que se está intentando utilizar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como vector en células que no se dividen, no obstante, su utilización despierta una lógica prevención y es también

comprensible que a pesar de los resultados conseguidos en los estudios preclínicos, las exigencias de bioseguridad retarden su aplicación en seres humanos.¹⁶

– Adenovirus:

En este caso, este vector puede infectar células independientemente de si se dividen o no, lo que posibilita su uso para la terapia génica *in vivo*. Además, admiten hasta 30 kb de carga genética foránea. En cuanto a desventaja, hay que tener en cuenta que no se integran en el cromosoma de las células que invaden por lo que desaparecerán con el tiempo y por lo tanto también su función terapéutica. Aunque esto también se podría considerar ventajoso en ciertos casos en los que queramos realizar un tratamiento transitorio repetido periódicamente, lo cual no se consideraría estrictamente terapéutico pero sería una opción más segura en algunas enfermedades.

Como problemas presenta su baja especificidad, aunque bien es cierto que dichos vectores pueden manipularse para dirigirse a tipos celulares específicos (tropismo) introduciéndoles genes que expresan proteínas de membrana que serán reconocidas por receptores específicos del tejido diana. Otro de los inconvenientes va a ser su gran respuesta inmunológica lo que puede llegar a provocar la muerte de la célula infectada.¹

– Virus asociados a los adenovirus:

Estos vectores son virus pequeños lo que les permite infectar neuronas, al poder atravesar la BHE, pero no les permite transportar genes grandes. Integran su genoma en un lugar específico del genoma de las células infectadas, minimizando el riesgo de mutagénesis insercional. No inducen respuesta inmunitaria y tienen como característica su incapacidad para replicarse en ausencia de un virus coinfectante como es el adenovirus. Los virus asociados a adenovirus no son inactivados en la sangre por lo que pueden usarse *in vivo*.¹⁴

– Otros: Herpes virus. Alfa virus, Pox virus están siendo estudiados.

En cuanto al herpes virus se ha demostrado capaz de introducir genes en las neuronas pero sin integrar su ADN, es decir, lo deja libre en forma de episoma durante toda la vida de la célula. Como problema presenta, al igual que los adenovirus, su gran capacidad para producir respuestas inmunológicas.¹

En la actualidad se están investigando nuevos vectores debido al peligro que acarrear los virus como vectores. Este peligro es el poco conocimiento que se tiene sobre la posibilidad de recombinación de estos vectores víricos con virus endémicos latentes en el individuo y con ello la posibilidad de crear nuevos virus con capacidad infecciosa desconocida. Para intentar evitar todos los problemas que conllevan este tipo de vectores se han desarrollado otros vectores:

b) Vectores no virales:

- Liposomas: Consiste en la transferencia del gen terapéutico contenido en liposomas a la célula, gracias a la fusión entre los lípidos del liposoma y los de la membrana celular. El problema que presenta este tipo de vectores es la baja especificidad de las células diana en la terapia *in vivo* y la baja eficacia de la transferencia. El problema de la especificidad está tratando de ser solucionado ayudándose de la introducción de epítomos en el revestimiento del liposoma que ayuden a ser solamente reconocidos por aquellas células que presenten moléculas receptoras específicas para los epítomos introducidos.¹

- ADN desnudo: Consiste en la inyección de ADN directamente en el tejido diana sin ningún revestimiento que lo proteja, sin embargo, en el interior de la célula es protegido por elementos de la propia célula lo que le permite replicarse. Esta técnica de inyección se utiliza sobre todo en el músculo esquelético y se ve favorecida por la utilización de la electroporación o electrotransfección, que consiste en la aplicación de un pulso eléctrico que genera poros transitorios en la membrana celular.¹⁴ Otra alternativa a esto sería la utilización de microesferas de metal (“biolistic” o “gene gun”) dentro de las cuales está contenido el ADN, y que se proyectarán a enorme velocidad sobre las células que deben modificarse con el fin de cruzar su pared. Ambas técnicas presentan como principal problema su baja especificidad.^{1,6,14}

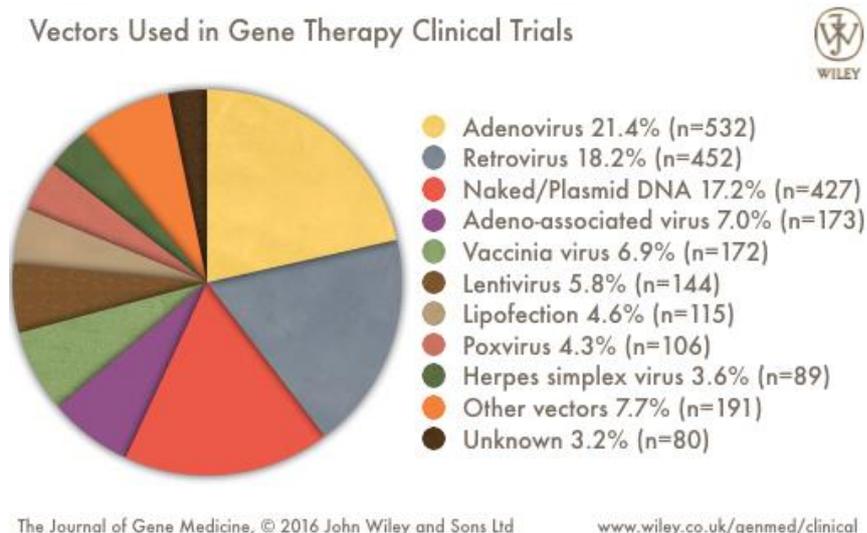


Figura 9. Vectores más usados en ensayos de terapia génica.¹⁰

Un aspecto importante a recalcar es que tenemos vectores que integran el ADN en el cromosoma de la célula (retrovirus, virus asociados a adenovirus) y otros que no lo hacen (adenovirus, DNA desnudo). Esta característica tiene sus ventajas y sus inconvenientes y es uno de los puntos clave en los que tenemos que pensar a la hora de elegir un vector u otro dependiendo de nuestro fin terapéutico.^{3,4}

Vectores que integran el DNA en el cromosoma:²

- **Ventajas:** Expresión estable a largo plazo, por lo tanto, posibilidad de curación de un trastorno genético.
- **Desventajas:** Inserción al azar. Excepto en el caso de los virus asociados a adenovirus que integran el DNA en un sitio específico del genoma humano, lo cual no tendrá consecuencias patológicas.

La inserción al azar conlleva dos tipos de riesgos:

- 1) Riesgo de muerte de la célula huésped por integración del vector en un gen crucial de la misma. Este riesgo es menor, pues la única consecuencia es que esa célula modificada, en particular, no sobrevivirá.
- 2) Riesgo de oncogénesis por la posible alteración de los patrones normales de expresión de genes que controlan la división y la proliferación celular. La terapia génica *ex vivo* puede aminorar en cierto modo esta desventaja ya que permite comprobar el fenotipo de las células que crecen en cultivo, evitando así la administración posterior al paciente de aquellas que presenten alguna evidencia de transformación neoplásica. Sin embargo, muchas células podrán desarrollar estas evidencias más tarde, por lo que ésta sigue siendo la principal desventaja de los vectores integrativos.

Vectores que no se integran en el cromosoma:²

Son útiles en los casos en los que no haga falta una expresión estable a largo plazo. Por ejemplo, las terapias génicas contra el cáncer suelen implicar la transferencia y la expresión de genes a células cancerosas con la intención de eliminarlas; una vez eliminado el tumor, el gen terapéutico puede no ser necesario nunca más. Sin embargo, para el resto de abordajes, la ausencia de integración normalmente supondrá la necesidad de repetir el tratamiento periódicamente.

	Retrovirus	Adenovirus	Virus asociados a adenovirus	DNA desnudo
Tamaño del gen	7-7.5 Kb	30 Kb	3.5-4 Kb	Ilimitado
Concentración (viriones/ml)	10 ⁸	10 ¹²	10 ¹¹	Ilimitado
Técnica de transferencia génica	Ex vivo	Ex e In vivo	Ex e In vivo	Ex e In vivo
Integración en genoma	Sí	No	Sí	Muy poco
Infectan células que no se dividen	No	Sí	Sí	Sí
Inconvenientes	Riesgo mutagénico	Respuesta inmunológica	Incapacidad para replicarse en ausencia de adenovirus	Baja especificidad

En la Fig.9 y en esta tabla comparativa quedan recogidas todas las características mencionadas de los vectores más utilizados.

Por tanto, en el caso de querer introducir un gen que produzca un aporte continuo y correcto de proteínas en el tejido afecto, lo más adecuado sería utilizar vectores que integren su ADN en el ADN de la célula, es decir, los más adecuados serían los retrovirus y los virus asociados a adenovirus. Sin embargo, se han realizado ensayos con vectores cuya aportación del producto génico es transitoria, como son los adenovirus, que podrían ser utilizados con un efecto paliativo a largo plazo mediante la utilización de su tratamiento repetido periódicamente. No obstante, tenemos que tener en cuenta que a veces los genes terapéuticos utilizados para la corrección de estos errores puede que no lleguen a un número suficiente de células o funcionen mal.¹

Como alternativa a esto, la tecnología CRISPR/Cas9 mencionada anteriormente, permite generar modificaciones genéticas en células *ex vivo* utilizando vectores no integrativos, con gran especificidad y eficacia; de este modo, se evita la necesidad de utilizar un vector retroviral para obtener una modificación genética permanente.

7- ENSAYOS CLÍNICOS:

A continuación, se expondrán ejemplos representativos de ensayos clínicos de terapia génica llevados a cabo con éxito para combatir tanto enfermedades monogénicas como adquiridas.

INMUNODEFICIENCIA SEVERA COMBINADA SECUNDARIA A DEFICIENCIA DE ADA (SCID-ADA)

La inmunodeficiencia severa combinada secundaria a deficiencia de ADA (SCID-ADA) constituye entre el 10 y el 20% de todas las SCID y es una enfermedad producida como consecuencia de la mutación del enzima adenosina-desaminasa lo cual produce su déficit. Esta enzima en condiciones normales cataliza la desaminación de la desoxiadenosina a adenosina, por lo que su ausencia determina un acúmulo de desoxiadenosina trifosfato, que es un metabolito tóxico que afectará a la función de los linfocitos B y T lo que hará que haya un descenso de la producción de anticuerpos. Esta enfermedad puede debutar a partir de los dos años de vida, condición que se conoce como “niños burbuja”, los cuales son niños incapaces de desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada. El trasplante de médula ósea de un donante compatible (hermano) constituye la mejor alternativa terapéutica. Sin embargo, si no disponemos de donante, los pacientes pueden ser tratados con ADA bovina pegilada (PEG-ADA) que, en la mayor parte de los casos, corrige parcialmente la deficiencia inmune.^{1,14,27}

La terapia génica dirigida a la curación de esta enfermedad comenzó en el año 1990 y fue el primer ensayo de terapia génica exitoso. Esta terapia fue llevada a cabo por los doctores W. French Anderson y Michael Blaese, fue aplicada en dos niñas, de 4 y 9 años, y consistió en la introducción *ex vivo* del gen ADA en linfocitos T mediante un retrovirus. Dado que los linfocitos no son células madre y tienen una duración temporal limitada se sabía que, aún en el caso de que el ensayo tuviese éxito, la curación no sería definitiva por lo que tendría que ser repetida a intervalos regulares. Aunque los resultados fueron positivos y las niñas pudieron llevar desde entonces una vida normal, el tratamiento hubo de ser repetido, primero cada 1-2 meses y posteriormente cada 3-6 meses. Sin embargo, es difícil hacer una evaluación precisa

del mismo ya que la paciente fue tratada simultáneamente con PEG-ADA, un fármaco que incluye la proteína ADA normal y que es utilizado en los tratamientos convencionales de esta enfermedad.⁶ Doce años más tarde, los pacientes así tratados, a los que se les mantuvo la terapia con PEG-ADA, expresaban la enzima, pero a unos niveles muy bajos, probablemente subterapéuticos.

Sin embargo, posteriormente, científicos italianos del Hospital S. Raffaele de Milan llevaron a cabo un ensayo clínico en dos pacientes afectados de esta enfermedad utilizando la misma estrategia pero sin llevar a cabo la mieloablación y suspendiendo el tratamiento con PEG-ADA, lo cual era lo que probablemente anulaba la ventaja selectiva de las células genéticamente modificadas en el primer ensayo, y obtuvieron la reconstitución eficiente del sistema inmune de ambos pacientes.²³

Tenemos que tener en cuenta que, al igual que en la SCID-X1, las células genéticamente modificadas presentan una fuerte ventaja selectiva para proliferar o escapar de la apoptosis.¹⁴ Además, el tratamiento de las enfermedades hematológicas es relativamente más fácil debido a la capacidad de llevar a cabo la terapia génica *ex vivo*, es decir, en este caso el gen puede introducirse en los linfocitos o la médula ósea y el tejido diana se puede cultivar y seleccionar en el laboratorio antes de su reimplantación.¹ Este protocolo constituye uno de los ejemplos más significativos de la eficacia y la seguridad que la terapia génica puede ofrecer a pacientes con enfermedades monogénicas.²⁷

El 27 de Mayo de 2016 el Comité de la Agencia Europea de Medicamentos aprobó la comercialización de este tipo de terapia génica bajo el nombre de *Strimvelis* en pacientes con SCID-ADA que no podían ser tratados con trasplante de médula ósea. El Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la Agencia decidió que los beneficios de *Strimvelis* eran mayores que sus riesgos, ya que mejoraba la supervivencia de los pacientes, por lo que recomendó autorizar su uso en la UE. Los beneficios de *Strimvelis* se han demostrado en un estudio en el que participaron 12 pacientes con ADA-SCID. Los pacientes del estudio no tenían un donante adecuado de médula ósea y el tratamiento alternativo no había funcionado o no estaba disponible. Todos los pacientes recibieron tratamiento con *Strimvelis* y permanecían con vida 3 años después del tratamiento. La tasa de infecciones graves se redujo después del tratamiento y siguió disminuyendo con el seguimiento a largo plazo, más allá de 3 años. En relación con la seguridad, *Strimvelis* se toleró relativamente bien aunque los datos son limitados debido al escaso número de pacientes estudiados. El efecto adverso más frecuente, que puede afectar a 1 de cada 10 pacientes, es la fiebre. Además, puesto que *Strimvelis* se produce utilizando un retrovirus, podría haber un riesgo potencial de cáncer causado por cambios involuntarios en el material genético, aunque hasta ahora no se han observado casos de este tipo. También existe un riesgo potencial de enfermedad autoinmunitaria. Sin embargo, hay medidas en vigor destinadas a monitorizar estos acontecimientos una vez que el medicamento está en

uso, mediante la utilización de un registro de pacientes para estudiar su evolución a largo plazo.^{24,25}

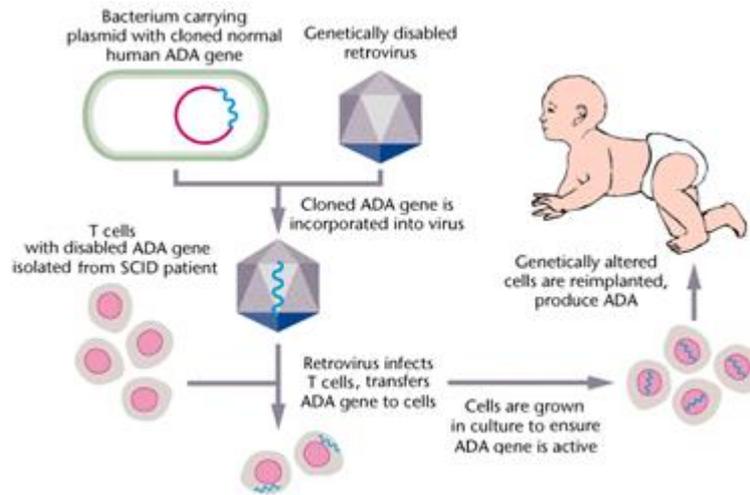


Figura 10. Ensayo clínico en SCID-ADA ²⁶

INMUNODEFICIENCIA SEVERA COMBINADA LIGADA AL CROMOSOMA X (SCID-X1)

La inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (SCID-X1) representa aproximadamente la mitad de todos los casos de SCID y es una enfermedad caracterizada por un defecto en el gen de la cadena gamma común (γ_c), la cual es responsable de codificar una parte de los receptores de las interleucinas 2, 4, 7, 9, 15 y 21. Se manifiesta como una ausencia casi total de linfocitos B, T y NK, lo cual dará lugar a infecciones graves durante los primeros años de vida ¹⁴. El protocolo de terapia génica llevado a cabo por el grupo francés de M. Cavazzana-Calvo y A. Fischer en el año 2000, consistió en la introducción *ex vivo* del gen γ_c en linfocitos T CD34+ mediante retrovirus, en ausencia de tratamiento mieloablativo. En 9 de los 10 niños tratados, los recuentos de linfocitos T alcanzaron cifras normales y con ello una evidente mejoría clínica. Posteriormente, estos resultados fueron confirmados por el equipo de Adrian Thrasher en Londres, los cuales obtuvieron una eficacia terapéutica del 100% al producir una mejoría clínica en los 6 pacientes tratados ^{9,28}. La clave del éxito viene determinada por el hecho de que las células genéticamente modificadas presentan una ventaja selectiva para proliferar, mientras que las células no corregidas mueren por apoptosis, lo cual da como resultado una repoblación completa por células T y NK genéticamente corregidas.⁵⁴

Sin embargo, 3 de los 10 pacientes tratados en el ensayo clínico francés, desarrollaron posteriormente leucemia linfocítica, lo cual supuso una desagradable sorpresa para toda la comunidad médica y científica. Se comprobó que en ambos casos el retrovirus utilizado se había insertado cerca de la región reguladora del protooncogén LMO2²⁹. Estudios posteriores evidenciaron que los retrovirus se insertan preferentemente en la proximidad o dentro de genes que se están transcribiendo activamente en el momento de la transducción⁹. Estos dos casos de leucemia generaron una gran respuesta por parte de los medios de comunicación y la sociedad, así como escepticismo por parte de la comunidad científica. Como consecuencia de ello, algunos países prohibieron los ensayos clínicos con vectores integrativos, lo cual condujo a una profunda recesión en el campo, llegándose a la paradoja de que había niños con SCID-X1 a los que se les estaba negando una terapia que podría salvarles la vida. El riesgo estimado de desarrollar leucemia por el tratamiento con retrovirus era del 15% (2 de 16 niños tratados) y la única alternativa terapéutica era un trasplante alogénico de médula ósea que presentaba una probabilidad de éxito del 90%, siempre y cuando el donante fuese un hermano compatible (disponible en menos de un tercio de los casos), o del 70% en caso de que el donante no fuera familiar del paciente. Sin embargo, los pacientes que son tratados con el trasplante de un donante no familiar, frecuentemente presentan complicaciones como la enfermedad del injerto contra el huésped o un riesgo aumentado de linfoma. Esto representaba un gran dilema ético, ya que la terapia génica constituía una alternativa superior al trasplante no relacionado. La realidad era que la terapia génica había salvado la vida a 15 de los 16 pacientes tratados (10 en Francia y 6 en Gran Bretaña) y que los 2 pacientes que habían desarrollado leucemia recibieron un trasplante de médula ósea no relacionado y se encuentran en remisión. En este momento, muchos países han eliminado la prohibición de la utilización de vectores integrativos o en su defecto lo permiten en casos individualizados.¹⁴

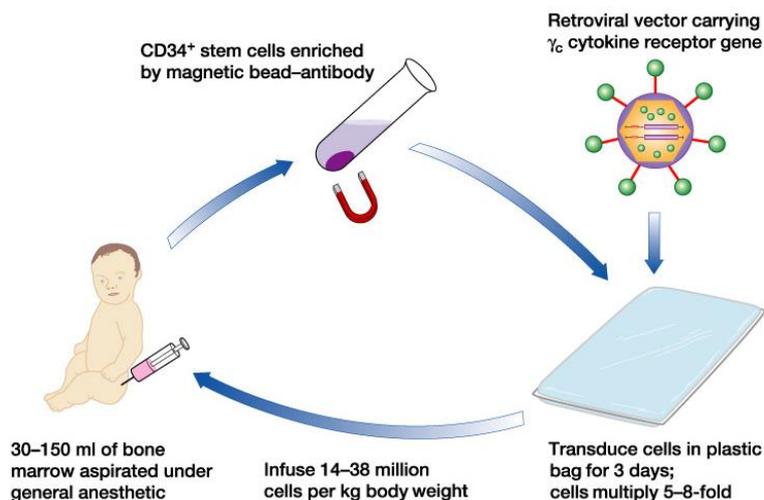


Figura 11. Ensayo clínico en SCID-X1⁶

HEMOFILIA (A y B)

La hemofilia es una enfermedad genética que sigue un patrón de herencia mendeliana recesivo ligado al cromosoma X. Se caracteriza por un defecto de la coagulación de la sangre debido al déficit de uno de los factores que intervienen en ella y que se manifiesta por la aparición de episodios de hemorragias espontáneas. El factor deficitario es el factor VIII en la hemofilia A, y el factor IX en la hemofilia B. Los niveles de factores de coagulación en plasma determinan la categoría de la hemofilia en leve (5-50% de los niveles normales), moderada (1-5% de los niveles normales) y severa (<1% de los niveles normales), esto determina un rango posible de clínica desde sangrados sólo tras lesiones o cirugías hasta episodios de sangrados espontáneos sin una causa identificable.⁵⁴

Actualmente, estos pacientes son tratados mediante la inyección de concentrados del factor de coagulación del cual presentan un déficit, lo cual mejora su calidad de vida y prolonga su esperanza de vida. Sin embargo, este tratamiento no es curativo, su precio es muy elevado, y en ciertas ocasiones algunos pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores contra los factores de coagulación administrados, lo que hace que este tratamiento no sea efectivo. Por ello el desarrollo de la terapia génica en esta enfermedad es muy importante para poder conseguir unos niveles altos mantenidos a lo largo del tiempo.³⁰

En las últimas dos décadas, se han llevado a cabo estudios tanto *in vivo* como *ex vivo* con diferentes tipos de vectores, tanto virales como no virales, dirigidos contra diferentes tipos de células: células madre hematopoyéticas, que expresarán el gen en su progenie a lo largo del tiempo, y hepatocitos y células del músculo esquelético, que son células que no se dividen. Parece lógico pensar que en la hemofilia deberíamos utilizar los hepatocitos como diana de la terapia génica ya que los factores de coagulación son fabricados en el hígado. Sin embargo, es importante considerar otros tejidos, sobretodo en pacientes que presenten algún tipo de hepatopatía. En estos estudios se comprobó que los vectores más prometedores parecían ser los lentivirus (retrovirus) y los virus asociados a adenovirus, los cuales habían sido útiles en modelos animales (ratones y perros).³³

Esto hizo que se llevara a cabo un ensayo clínico en pacientes con hemofilia A severa. Los pacientes toleraron bien el tratamiento pero la actividad del factor de coagulación VIII aumentó sólo ligeramente en unos pocos casos y además la expresión fue transitoria. Esta falta de eficacia podría estar explicada por las características del vector utilizado, un γ -retrovirus (virus de la leucemia murina), el cual sólo actúa sobre células en división. Los lentivirus parecen ser vectores más adecuados en este caso ya que a pesar de ser un tipo de retrovirus al igual que el γ -retrovirus, se diferencian en que no necesitan células en división para poder integrarse en su genoma. Por este motivo son capaces de actuar sobre los hepatocitos, resultando en una transferencia

génica más eficiente. Tenemos que tener en cuenta que en el hígado además de hepatocitos también están presentes las células presentadoras de antígenos (CPA), lo que hace que aumente el riesgo de una respuesta inmune contra los factores de coagulación VIII y IX. Esto ocurre sobre todo cuando los promotores usados no son específicos para hepatocitos. Además otro de los posibles efectos secundarios nocivos de esta terapia, sería la mutagénesis insercional y la activación de oncogenes. En los casos en los que utilicemos las células madre hematopoyéticas, podría ser de gran ayuda el uso de busulfan como régimen de precondicionamiento de la médula ósea, lo cual facilitará el desarrollo y proliferación de las células madres en las que han actuado los vectores, aunque esto puede suponer el desarrollo de efectos secundarios graves como la aparición de leucopenia, plaquetopenia y anemia secundaria a la mielosupresión. Además de las células madre hematopoyéticas, las células endoteliales también pueden ser objetivo de este tipo de terapia génica, ya que al expresar el factor de Von Willebrand, estabilizan el factor VIII, y por lo tanto podrían mejorar la eficacia terapéutica. Sin embargo, sigue siendo un reto generar progenitores endoteliales que sean capaces de desarrollarse de manera eficiente y persistente.³⁰

Otro de los vectores que podemos utilizar serían los virus asociados a adenovirus, en concreto, el más utilizado ha sido el serotipo 2. Este tipo de vector presenta como desventaja la poca capacidad de almacenamiento, lo que supone un obstáculo para el transporte de los genes de factores de coagulación que queremos utilizar. El uso de este tipo de vectores presenta un futuro prometedor debido a que, por ejemplo, ya ha mostrado eficacia clínica en pacientes con ceguera congénita. La primera terapia génica en la que se utilizó este vector para el tratamiento de la hemofilia tuvo como objetivo las células musculoesqueléticas. Estas células normalmente no producen FVIII ni FIX pero tienen como ventaja el fácil acceso a ellas. Herzog *et al.* ya demostraron una expresión estable del FIX en perros³¹. Nathwani *et al* llevaron a cabo un ensayo que incluyó a diez pacientes con hemofilia B severa. A estos les administró una única dosis del virus asociado a adenovirus serotipo 8, resultando en una expresión a largo plazo del factor IX asociado con una mejoría de la clínica. Además en un seguimiento de tres años, no apareció ningún tipo de efecto secundario relacionado con la terapia. Aunque la eliminación mediada por la inmunidad de los hepatocitos transducidos sigue siendo una preocupación, este proceso puede ser controlado con un curso corto de glucocorticoides sin pérdida de expresión transgénica.³²

En vista del éxito de los ensayos realizados hasta el momento, parece que en un futuro no muy lejano se producirá la comercialización de esta terapia; en concreto, del tratamiento AMT-060 para la hemofilia B, el cual ha sido recientemente distinguido como medicamento prioritario (PRIME) por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), y que previamente había sido designado “breakthrough therapy” por la agencia americana FDA.⁶⁰

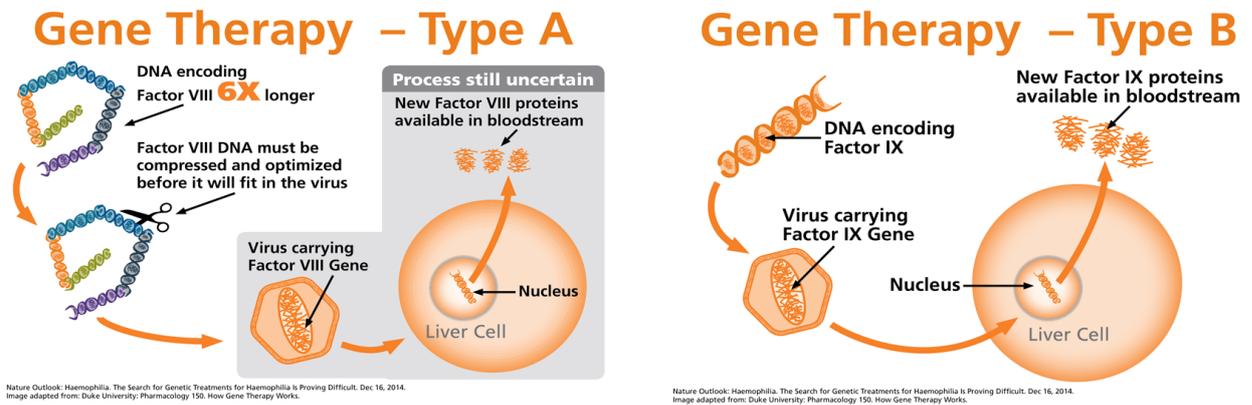


Figura 12. Terapia génica en hemofilia A y B. ³⁴

AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER

La amaurosis congénita de Leber (LCA) es una retinopatía de origen genético, caracterizada por un grave déficit visual en los niños desde los primeros meses de vida producida como consecuencia de una gran pérdida de conos y bastones en toda la retina desde el nacimiento. Se caracteriza por su gran heterogeneidad tanto clínica como genética, aunque su patrón de herencia es generalmente autosómico recesivo, se han descrito casos con herencia autosómica dominante. Su prevalencia se estima en 1 de 81000 nacidos vivos y no existe ningún tratamiento eficaz hasta la fecha, de ahí que la terapia génica pueda jugar un papel importante en esta enfermedad.

La clasificación genética OMIM reconoce actualmente 18 tipos de LCA. Aproximadamente el 6% de los casos son constituidos por la LCA tipo 2, que es producida por la mutación del gen RPE65 (*retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*), el cual juega un papel fundamental en el ciclo visual. Esta proteína es la enzima encargada de regenerar el pigmento visual después de la exposición a la luz. Un déficit de RPE65 funcional resulta en una deficiencia de 11-cis retinal, de modo que los bastones son incapaces de responder a la luz. Los conos pueden tener acceso al cromóforo 11-cis-retinaldehído a través de una vía alternativa que no depende del epitelio pigmentario retiniano derivado de RPE65, permitiendo así la visión en niños con amaurosis congénita de Leber. Sin embargo, la degeneración progresiva de los fotorreceptores y el acúmulo tóxico de ésteres de retinilo, conlleva la producción de un deterioro severo en la vista ya detectable en adultos jóvenes.

Gracias a este conocimiento se llevaron a cabo ensayos clínicos tanto en animales como en humanos en los que se vio que esta técnica era segura y eficaz a la hora de restaurar la visión en la mayor parte de los sujetos sometidos a la terapia. En cuanto al vector, el virus asociado a adenovirus ha demostrado ser seguro y eficaz para la administración génica en esta enfermedad. Actualmente, al menos 9 serotipos han sido evaluados para su uso ocular.

Los primeros ensayos clínicos fueron llevados a cabo en ratones menores de 2,5 meses, que presentaban un déficit de la proteína RPE65. En este ensayo se administró el vector virus asociado a adenovirus serotipo 1 en la zona subretiniana, tras lo cual se obtuvieron resultados positivos en aproximadamente el 75% de los ratones, objetivado gracias a la evaluación a través de electrorretinografía. Además, también se probó la utilización de otros serotipos, como por ejemplo, el serotipo 5, que también mostró una alta eficacia en la electrorretinografía, en la que se observó la restauración de la función de la retina. Otro de los serotipos probados fue el serotipo 2, que sin embargo, a diferencia de los otros, mostró menos capacidad de transducción.³⁵

Los estudios llevados a cabo en perros que presentaban alteraciones en el gen RPE65 proporcionaron un importante impulso para el desarrollo de ensayos clínicos de ese tipo en humanos. En el primer ensayo clínico llevado a cabo en perros, se inyectó un virus asociado a adenovirus serotipo 2 que contenía el gen RPE65. En algunos perros fue inyectado en la zona subretiniana y en otros en el interior de la cavidad vítrea. Tras 3 meses, las respuestas observadas en la electrorretinografía fueron más favorables para aquellos perros que fueron inyectados en la zona subretiniana que aquellos que recibieron la administración dentro de la cavidad vítrea. Estos últimos, de hecho, no mostraron ninguna mejoría respecto a los perros no tratados. Acland *et al* llevaron a cabo en 2005 un estudio que consistía en la inyección subretiniana de RPE65 cDNA en 26 ojos de perros, los cuales fueron comparados con 45 controles, que eran perros con la misma enfermedad pero no tratados. Del total de los 26 perros tratados, 23 mostraron mejoría en la función visual. Este experimento fue el primero en demostrar la restauración casi completa de ambos fotorreceptores, tanto conos como bastones.³⁶

Jacobson *et al* investigaron la toxicidad de esta terapia, en la que encontraron como efectos adversos una moderada reacción conjuntival en 15 de los 30 perros tratados, que disminuyó a los 3 meses, la aparición de cataratas en 6 de los 30 perros estudiados y la aparición de una lesión pigmentada en el lugar de inyección a los 3 meses en 25 de los 30 perros tratados. Además en aquellos perros que fueron tratados con dosis altas del vector, apareció un adelgazamiento de la capa nuclear externa de la retina.³⁷

En cuanto a la mejora a largo plazo de la función retiniana en perros tras la aplicación de esta terapia génica, la respuesta de la electrorretinografía se mantuvo intacta tras 3 años de seguimiento de los dos animales inyectados a los 4 meses de edad por Acland *et al* en 2001³⁸, al igual que tras un año de seguimiento en los 2 perros de 8 meses inyectados en la zona subretiniana por Le Meur *et al*.³⁹

Este tipo de vector también fue probado en monos, animales cuya anatomía ocular es muy similar a la de los humanos. Los primeros ensayos clínicos buscaban determinar la seguridad, eficacia y especificidad del vector, por lo que introdujeron en

su interior el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), y todo ello lo inyectaron en 4 monos. Tras 1 año de la inyección, la expresión del gen se mantenía estable en las células de la retina y además sin mostrar ningún tipo de toxicidad.

Los tres primeros ensayos clínicos llevados a cabo en humanos, tuvieron lugar en el año 2007 y fueron llevados a cabo por la University College London, Moorfields Eye Hospital de Londres, Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), Second University of Napoli, University of Pennsylvania (UPenn) y University of Florida (UFL). En estos ensayos se incluyeron entre 9 y 12 pacientes con edades comprendidas entre los 5 y los 44 años y se utilizó el vector AAV serotipo 2 para la inserción de RPE65. En cada ensayo clínico, los pacientes fueron divididos en 3 cohortes, dependiendo de la dosis administrada (baja, media o alta).³⁵

Los primeros objetivos de esta terapia fueron la determinación de la seguridad de la técnica. Respecto a este punto, no se evidenció ningún tipo de evento adverso en cuanto a toxicidad o aparición de respuesta inmune. La inyección intraoperatoria concluyó con normalidad sin ninguna complicación en todos los pacientes excepto en un paciente del ensayo clínico llevado a cabo por CHOP, que presentó una perforación macular, y un paciente del ensayo clínico llevado a cabo por UPenn / UFL, que presentó un adelgazamiento de la fovea.³⁷

El segundo objetivo del estudio consistía en determinar la eficacia del ensayo que fue determinado gracias a la evaluación de la sensibilidad retiniana, la respuesta pupilar, el campo visual, la agudeza visual, el nistagmo, la movilidad y / o respuesta a la estimulación lumínica³⁵:

- Sensibilidad retiniana: los tres ensayos clínicos informaron mejoría de la sensibilidad de la retina (aumento de la sensibilidad a la luz, localizada en las regiones retinianas tratadas) en la mayor parte de los pacientes, tanto a corto como a largo plazo. El ensayo llevado a cabo por CHOP informó de la mejora en la visión de luz tenue por parte de los 12 sujetos del ensayo, comenzando la mejoría en algunos pacientes 2 semanas después de la cirugía, y que permanecía en el seguimiento a los 1,5 años. En el estudio de la UPenn / UFL, los tres pacientes en la cohorte de dosis baja informaron aumento de la visión en condiciones de luz tenue en el ojo del estudio. A su vez, el estudio de Moorfields informó mejoría en la sensibilidad de la retina en uno de los tres pacientes en la cohorte de dosis bajas.
- Respuesta pupilar: de los 11 pacientes evaluados para la respuesta pupilar de la retina a la luz en el ensayo CHOP, todos habían mejorado, de hecho, un niño de 8 años de edad incluido en el ensayo había alcanzado casi el mismo nivel de sensibilidad a la luz que el de los niños de su misma edad con una visión normal. Dentro de los primeros tres pacientes tratados en este mismo estudio, la mejora de la respuesta pupilar persistió en el seguimiento tras 1,5 años. El estudio UPenn /

UFL encontró que dos de los tres pacientes evaluados tenían un reflejo pupilar mejorado al mes del tratamiento.

- Campo visual: el estudio CHOP encontró una mejoría en el campo visual de los 12 pacientes del estudio: en el 1^{er} mes para 10 de los pacientes, a los 2,75 meses para el 11^o paciente y a los 4,75 meses para el 12^o paciente. Además, estas mejoras se mantuvieron en el seguimiento de 1,5 años. El estudio UPenn / UFL encontró un aumento de los campos visuales en el 1^{er} mes para los tres pacientes en la cohorte de dosis bajas, que seguía manteniéndose al año. El estudio de Moorfields no encontró ningún cambio clínicamente significativo en los campos visuales de los tres pacientes en la cohorte de dosis bajas.
- Agudeza visual: el ensayo clínico llevado a cabo por CHOP informó de una significativa mejoría en la agudeza visual en los tres pacientes en la cohorte de dosis baja, en tres de seis pacientes en la cohorte de dosis intermedia y en uno de tres pacientes en la cohorte de dosis alta. Esta mejora continuó o se mantuvo estable hasta el seguimiento a los 1,5 años. Los otros dos ensayos clínicos no encontraron cambios estadísticamente significativos en la agudeza visual en un total de seis pacientes seguidos durante un año.
- Desarrollo de pseudo-fóvea: en el ensayo clínico UPenn / UFL, un paciente informó una mejora de la visión en el seguimiento al año, aunque las pruebas no mostraron cambios medibles en la agudeza visual o sensibilidad visual. Los investigadores cuantificaron la fijación de la mirada de este paciente a dianas de luz tenue, así como el tiempo de permanencia de la fijación. Los resultados sugieren que la lenta ganancia visual de este paciente fue acompañada en el ojo tratado por un cambio en la fijación foveal en el área tratada de la retina, que creó una pseudo-fóvea.
- Nistagmo: Los investigadores encontraron una reducción medible en el nistagmus en los tres primeros pacientes del estudio CHOP, y esta mejora se mantuvo en el seguimiento a los 1,5 años. Sin embargo, ningún paciente en los estudios UPenn / UFL o Moorfields mostró una reducción del nistagmo.
- Movilidad: Cuatro pacientes en el estudio CHOP mejoraron la movilidad tras la terapia génica. Un paciente en el estudio de Moorfields mostró una mejor movilidad después del tratamiento en las visitas de seguimiento de 5 y 6 meses.
- Respuesta en la electroretinografía: No fueron detectadas mejoras en la electroretinografía en ninguno de los tres ensayos clínicos excepto en un paciente. Sin embargo, es posible que la mejora no haya podido determinarse debido a que el área tratada era demasiado pequeña para producir una respuesta favorable.

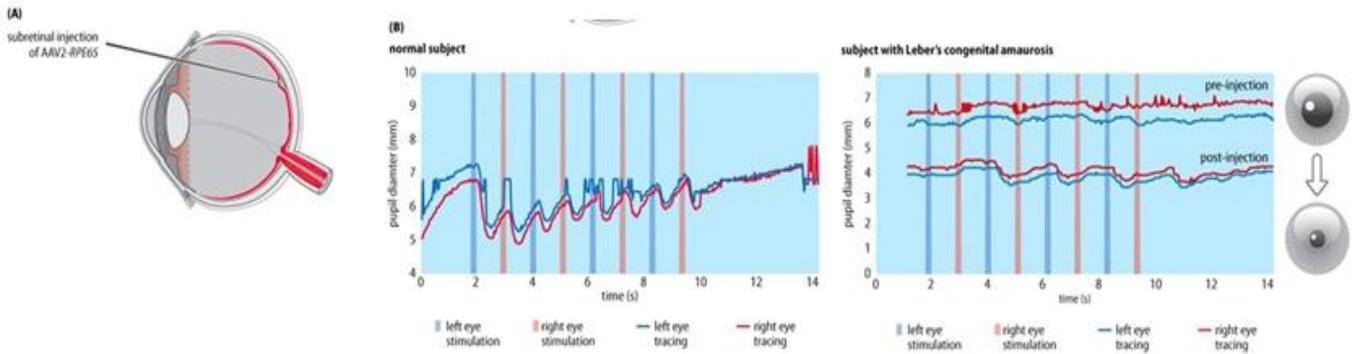


Figure 9.22 Genetics and Genomics in Medicine (© Garland Science 2015)

Figura 13. Terapia génica en amaurosis congénita de Leber ⁴⁰

Posteriormente a estos tres primeros ensayos clínicos en humanos en los que mostraron seguridad y una modesta eficacia, se inició un cuarto ensayo en 15 pacientes llevado a cabo por Jacobson *et al* en 2011 en el que utilizaron el mismo vector y se les siguió a lo largo de 3 años. En este, más allá de los incrementos iniciales en la sensibilidad visual después del tratamiento, se detectó un movimiento lento y progresivo de fijación durante muchos meses desde la fóvea anatómica a la región retiniana tratada, al igual que en los otros tres ensayos clínicos. La mejora de la función visual se presentó en todos los pacientes en diferente grado sobre todo en las zonas tratadas. Además, no se observó ninguna toxicidad sistémica y los únicos eventos adversos presentados fueron debidos al procedimiento quirúrgico.⁵⁶

Sin embargo, el ensayo clínico más avanzado en este campo es el realizado por Spark Therapeutics (Filadelfia, PA), una spin-off del Children's Hospital of Philadelphia. Spark Therapeutics anunció el 9 de Enero de 2017 nuevos datos muy alentadores sobre el seguimiento de cuatro años de pacientes de su ensayo clínico. El 18 de mayo de 2017, la compañía solicitó la BLA (*biologics license application*) a la FDA, es decir, la aprobación para la comercialización de *voretigene neparvovec*, nombre que adjudicaron al vector utilizado, un AAV serotipo 2. No hay garantías de que el tratamiento será aprobado, pero dados los datos de seguridad clínica y eficacia reportados en los últimos años, tenemos buenas razones para ser cautelosamente optimistas. La aprobación, por tanto, lo convertiría probablemente en la primera terapia génica aprobada por la FDA para una enfermedad ocular.^{57,58}

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE Y BECKER

La distrofia muscular de Duchenne es una miopatía de origen genético con un patrón de herencia de tipo recesivo ligado al cromosoma X, por lo que se manifiesta más comúnmente en hombres que en mujeres, que normalmente suelen ser portadoras. Es una enfermedad monogénica producida por mutaciones de pérdida de función en el gen denominado distrofina. La distrofia muscular de Becker es producida por el mismo mecanismo, sin embargo, en este caso, lo que ocurre es que la delección impide la fabricación de una gran parte de la proteína normal, fabricando una distrofina más corta. La distrofina es la proteína encargada de conectar los filamentos de actina con la matriz extracelular, por lo que al existir esta mutación, se va a producir la degeneración de las células musculares que serán reemplazadas por tejido adiposo.⁴¹

Para que la terapia génica en esta enfermedad se lleve a cabo con éxito, se necesitará llevar a cabo una administración sistémica de la distrofina funcional, que consiga llegar a la mayor parte de las células de músculo estriado y si es posible también a las células de músculo liso. Estudios recientes sugieren que el vector más recomendable en este caso sería el virus asociado a adenovirus, a pesar de su pequeña capacidad de almacenamiento. El desarrollo de ADNc de micro-distrofina sintética regulado por promotores específicos del músculo, parece mostrar unos resultados prometedores para poder superar este obstáculo. A su vez, también se propuso la utilización de la administración de varios vectores al mismo tiempo, cuyas respectivas secuencias génicas se unirían por recombinación homóloga en el tejido diana.⁴²

En cuanto al vector utilizado, en la actualidad no se ha alcanzado un consenso de opinión en cuanto a qué serotipo muestra mejor eficacia de transducción en los diferentes tejidos. Sin embargo, una serie de estudios han demostrado una alta eficiencia de transducción de los virus asociados a adenovirus serotipos 1, 6, 7, 8 y 9 en el músculo estriado. La principal barrera para la aplicación de este enfoque terapéutico es la necesidad de desarrollar estrategias para administrar estos vectores que contienen la micro-distrofina sin producir ningún tipo de toxicidad o estimulación de una respuesta inmune perjudicial contra el vector o la distrofina.⁴²

Los modelos animales para DMD han sido indispensables para proporcionar una comprensión más completa de la progresión de la enfermedad, la patogénesis y la evaluación de nuevas terapias. El modelo DMD más utilizado es el ratón mdx, el cual presenta una mutación puntual que conlleva la producción de una distrofina pequeña no funcional. Como resultado, el ratón presenta una DMB. La liberación sistémica en estos ratones, tanto por vía intravenosa como por vía intraarterial (femoral), del vector serotipo 6 que contiene la micro-distrofina, ha sido efectiva para llevar a cabo la transducción completa en todas las células musculares de su cuerpo. También se han mostrado igualmente eficaces los serotipos 8 y 9. Sin embargo, la administración

sistémica en modelos caninos ha mostrado ser un desafío mayor. En primer lugar, debido al mayor tamaño del animal, la cantidad necesaria de vector es mucho mayor. En segundo lugar, la respuesta inmune a su vez es mayor, por lo que todo ello resultará en una menor expresión del gen transducido.⁴³

Dado los muchos desafíos que aún existen, los ensayos clínicos actuales no han progresado más allá de la fase I, que únicamente tiene como objetivo determinar la eficacia en la entrega del transgen al músculo y la evaluación de la respuesta inmune. En un ensayo clínico llevado a cabo en 6 niños de entre 5 y 11 años, se les inyectó en el bíceps el vector, un híbrido entre el serotipo 1 y 2, que contenía el gen funcional. Previamente a esto, 4 horas antes en concreto, se les había administrado metilprednisolona para evitar la respuesta inmune. Los primeros resultados observados en biopsias musculares y análisis bioquímicos de la sangre de estos pacientes mostraron poca presencia de distrofina en los 6 niños, así como una respuesta inmune contra la micro-distrofina en 2 pacientes y contra la cápside del vector en 5 pacientes. Por lo tanto, parece que la expresión génica puede haber sido disminuida por esta respuesta inmune.

Algunas de las soluciones a este problema podrían ser la introducción en el vector de un promotor específico para las células musculares, la utilización de otro serotipo del vector, la llevada a cabo de estrategias eficaces para bloquear la respuesta inmune o la administración de micro-utrofina en el lugar de micro-distrofina.⁴³

Durante el desarrollo del músculo fetal humano, la utrofina se encuentra en el sarcolema antes de que se exprese la distrofina. Una vez que la distrofina se expresa, la utrofina desaparece de la membrana. En el músculo adulto normal, la utrofina se localiza en la sinapsis neuromuscular y en las uniones miotendinosas donde participa en el mantenimiento de la membrana postsináptica y en el agrupamiento del receptor de la acetilcolina. En los músculos de pacientes con Duchenne y de mujeres portadoras, la expresión de la proteína utrofina está muy aumentada, aunque no lo suficiente como para compensar la ausencia de distrofina.⁵⁹

La utrofina constituye una proteína similar a la distrofina, comparte con ella similitudes tanto en estructura como en función, por lo que se ha mostrado capaz de sustituirla. Una ventaja adicional proviene del hecho de que la utrofina se expresa ampliamente en pacientes con DMD y por lo tanto el suministro genético evitaría respuestas inmunes celulares destructivas como ocurre con la distrofina. Además, se ha evidenciado la capacidad de la utrofina para compensar y por lo tanto aliviar las consecuencias de la falta de distrofina en la zona de la falange distal del pie y los músculos extraoculares, donde la expresión de utrofina es normalmente alta y cuyos músculos son resistentes a la distrofia en pacientes con DMD. En ratones mdx, se ha observado que la administración intravenosa del vector con la micro-utrofina producía un aumento en el tamaño de las miofibrillas además de una mejora del rendimiento

fisiológico comparado con los ratones no tratados. Por lo tanto, podemos concluir que había una evidente mejora del fenotipo distrófico.⁴⁴

FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística es una de las enfermedades monogénicas más frecuentes en la raza caucásica. Se caracteriza por presentar una herencia autosómica recesiva producida por una mutación en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. Esta proteína interviene en el paso del ion cloro a través de las membranas celulares y su deficiencia altera la producción de sudor, jugos gástricos y moco. La enfermedad se desarrolla, por tanto, cuando ninguno de los dos alelos es funcional. Afecta principalmente a los pulmones, y en menor medida al páncreas, hígado e intestino, provocando la acumulación de moco espeso en estas zonas y un sudor con cantidades excesivas de sal por parte de las glándulas sudoríparas al no ser capaces de reabsorber el cloro. Es uno de los tipos de enfermedad pulmonar crónica más común en niños y adultos jóvenes, y es un trastorno potencialmente mortal. Los pacientes suelen fallecer por infecciones pulmonares debido a *Pseudomonas* o *Staphylococcus*.

La fibrosis quística fue definida por primera vez en 1938, pero el gen CFTR no fue identificado hasta 1989, lo que abrió las puertas hacia el desarrollo de la terapia génica en esta enfermedad. Hasta la fecha han sido identificadas más de 1990 mutaciones dentro del gen CFTR, agrupadas en 6 clases, pero no todas han sido categorizadas como causantes de enfermedad. La mutación más frecuente en todo el mundo es una delección de fenilalanina, Phe508del, anteriormente llamada $\Delta F508$.²³

La utilización de antibióticos, suero salino hipertónico y mucolíticos como la dornasa alfa, han aumentado la supervivencia que se encuentra actualmente en torno a los 40 años. Sin embargo, la supervivencia en esta enfermedad podría incrementarse si conseguimos una terapia génica eficaz y segura en el ser humano. Hasta la fecha se han llevado a cabo aproximadamente 26 ensayos clínicos que involucraron a 450 personas. La mayor parte de los ensayos fueron cortos e incluyeron un pequeño número de pacientes. Su fin no era alcanzar un beneficio clínico sino establecer la seguridad de la transferencia génica.

La primera duda que se nos plantea para llevar a cabo un ensayo de terapia génica en esta enfermedad es el tipo de célula al que dirigiremos la terapia. El gen CFTR se expresa en varias zonas y células del pulmón, pero parece que las células epiteliales de la vía aérea son las células más adecuadas para llevar a cabo la transferencia génica.

En cuanto al vector, los adenovirus fueron los primeros usados para esta terapia, debido a su tropismo natural por el pulmón y su gran capacidad de almacenamiento. Sin embargo, desde 1994, se llevaron a cabo 9 ensayos clínicos en los que fue utilizado este vector, y en los que se observó que no era adecuado para esta terapia. Esto era debido a que la transferencia génica no era muy eficiente y además era transitoria. Así mismo, se produjeron respuestas inmunológicas lo que disminuían aún más su eficacia.

Otro tipo de vectores utilizados fueron los virus asociados a adenovirus, que tenían en común con los adenovirus su tropismo por el pulmón, pero tenían mucha menos capacidad de almacenamiento. En 1998 fue publicado el primer ensayo clínico con este vector, en concreto el virus asociado a adenovirus serotipo 2, aunque más tarde se vería que otros serotipos parecían tener una mayor eficacia de transferencia génica. Tras este primer ensayo, se llevaron a cabo 6 ensayos clínicos más en tan sólo 8 años. En la fase I se administró una sola dosis en la que se comprobó la seguridad de esta técnica, la cual arrojó resultados positivos. Tras esto se llevó a cabo un estudio en el que se administraron varias dosis, y con el cual se intentaba detectar si esta terapia producía una mejora de la función pulmonar, lo cual no fue así. Estos resultados tan desalentadores podrían ser consecuencia de una baja eficacia en la transferencia génica de estos vectores, ineficacia del promotor utilizado *in vivo* a pesar de sus buenos resultados *ex vivo* y el desarrollo de una respuesta inmune que hace ineficaz la administración repetida. Otra de las barreras que debe ser paliada en un futuro fue descrita por Mint *et al*, el cual demostró que la presencia de infecciones respiratorias en el momento de la transferencia o infecciones respiratorias resueltas recientemente, disminuían la eficacia de la transferencia génica, lo cual es muy importante ya que la mayoría de los pacientes sufren este tipo de infecciones.²¹

Liu *et al* demostraron la capacidad de estos vectores para transducir células madre en los pulmones de ratones, lo que significaría que de tener la misma eficacia en humanos, ayudaría a vencer el problema de las administraciones repetidas⁴⁵. A su vez, Faust *et al* demostraron que la eliminación de los dinucleótidos CpG de dicho vector reduciría la activación del receptor Toll-like 9 y por tanto reduciría la inflamación y prolongaría la expresión del gen transferido.⁴⁶

Como hemos mencionado anteriormente, el vector virus asociado a adenovirus tiene una capacidad limitada de almacenamiento, prácticamente lo que ocupa el gen CFTR, que es aproximadamente 4.7 kb, lo cual no permite la introducción de un promotor potente. Por ello, una de las estrategias propuestas fue la utilización de 2 vectores, es decir 2 virus asociados a adenovirus, usando así el trans-splicing. Otra de las estrategias, propuesta por Yan *et al*, fue la utilización de virus quiméricos constituidos por la cápside de un parvovirus, el HBoV1, dentro de la cual introdujo el virus asociado a adenovirus serotipo 2 el cual portaba el gen CFTR. Esta propuesta mostró una eficacia mayor *in vitro* que la utilización del vector en solitario, sin embargo, aún no ha sido probado *in vivo*.

Otro de los vectores utilizados han sido los retrovirus, en concreto los lentivirus. Estos vectores no han mostrado tropismo por el pulmón, por lo que necesitan unas proteínas de envoltura adecuadas para lograr una transducción eficiente. En un ensayo clínico en ratones llevado a cabo con una sola dosis de un lentivirus, el SIV (virus de la inmunodeficiencia en simios) envuelto por las proteínas F y HN del SeV (virus sendai murino), se produjo una transferencia génica eficiente que se perpetuó durante toda la vida del ratón. Además también se demostró la posibilidad de llevar a cabo varias administraciones sin que esto disminuyera la eficacia, lo que suponía que los lentivirus eran más efectivos a la hora de escapar de la respuesta adaptativa que los vectores mencionados anteriormente. Estas características convierten a los lentivirus en unos candidatos atractivos para el futuro de la terapia génica de la fibrosis quística.²¹

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad producida como consecuencia del acumulo de daños genéticos lo que va a provocar una división descontrolada de las células. Este crecimiento anómalo puede producirse como consecuencia de un fallo en la división celular, un fallo en la regulación de la apoptosis o un fallo en los sistemas de reparación de errores.

Los requisitos especiales de transducción eficiente y transitoria que presenta la terapia génica del cáncer explican que el vector más utilizado sea el adenovirus (adenovirus humano tipo 5). Las primeras aproximaciones clínicas contra el cáncer han sido la inyección directa en el tumor o en la cavidad que lo alberga (por ejemplo, en la cavidad pleural para el mesotelioma, en la cavidad peritoneal para el cáncer de ovario o intravesicular en el cáncer de vejiga). Sin embargo, el tratamiento del cáncer diseminado requiere la administración sistémica en el torrente sanguíneo. En este último caso el adenovirus humano tipo 5 presenta un grave inconveniente por su marcado tropismo hacia el hígado. De hecho, la principal limitación de esta técnica es la hepatotoxicidad, por la cual se producirá una elevación de las transaminasas.¹⁴

En raras ocasiones, es suficiente con restablecer la función de uno de los genes alterados en la célula tumoral. Cuando la célula se ha diseminado vía linfática o sanguínea y se ha implantado en otros tejidos, la reparación de un solo defecto genético no consigue convertirla en una célula normal, por lo que en este caso se plantearía como objetivo la destrucción de la célula tumoral. Para ello se están llevando a cabo ensayos que proponen conseguir que la propia célula cancerosa produzca sustancias tóxicas para sí misma, se produzca un aumento de la respuesta inmunológica o se inhiba el aporte de sangre a los tumores. Otro método también sería la fabricación de anticuerpos intracelulares que bloqueen la proteína anómala o

proteínas antagónicas que inhiban específicamente la interacción de una proteína mutada.¹

a) Supresión de oncogenes:

Las células tumorales se caracterizan por presentar una activación aberrante de oncogenes que estimulan la proliferación celular y una pérdida de genes supresores tumorales, los cuales tienen la función de controlar el ciclo celular y la apoptosis. Al introducir genes supresores de tumores como por ejemplo Rb, p16 y p53 o al inhibir la expresión de oncogenes como Ras, inhibimos la proliferación celular e inducimos la apoptosis.

Por ejemplo, la proteína RAS junto con el gen que lleva el mismo nombre, son un conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos: integridad del citoesqueleto, proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular y la apoptosis. Tanto el gen como las proteínas RAS relacionadas, a menudo están alterados en los tumores malignos, provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y una disminución de la apoptosis. En estos casos, la estrategia a seguir sería la inhibición de la señal errónea producida por la mutación del gen. Para ello podemos llevar a cabo la estrategia antisentido, que consiste en la fabricación de un "oligonucleótido antisentido" que será una copia complementaria del ARN mensajero mutado producido por el gen endógeno de la célula, y que hibridará con éste para neutralizarlo o desnaturalizarlo si se utilizan ribozimas, es decir, evitará la síntesis de la proteína RAS anormal. El mayor problema de este tipo de terapia génica es asegurarse de que todas las células tumorales reciben el oligonucleótido antisentido, ya que cualquiera que escape tendrá una ventaja proliferativa sobre las otras y prevalecerá induciendo de nuevo el tumor.¹⁴

Sin embargo, estos oligómeros presentan dos problemas. El primero es que portan una carga negativa en la cadena del grupo fosfato por lo que presentaban dificultades para atravesar las membranas celulares. El segundo es que las células presentan enzimas que degradan el ADN foráneo, lo que resultaría en una degradación de aquellos oligómeros que consiguieran entrar. Para solucionar ambos problemas se sustituyó un átomo de oxígeno de cada grupo fosfato por un grupo metilo, lo cual conseguía convertir los fosfatos cargados negativamente en unidades sin carga, los metilfosfonatos.

El primer oligómero fue sintetizado en 1978 con el fin de reconocer el ARN mensajero del retrovirus responsable del sarcoma de Rous en pollos. Se observó que la utilización de dicho oligómero disminuía la replicación del virus en la célula lo que parecía indicar que bloqueaba la producción de proteínas víricas. Los oligonucleótidos

antisentido pueden, por lo tanto, bloquear la traducción al menos de dos maneras: obstaculizando la lectura normal del ARN de la célula y además, al unirse al ARN mensajero de dicha célula hace posible que la ribonucleasa H destruya dicho ARN. Hasta el momento, han tenido éxito in vitro, oligonucleótidos contra RAS, p53, myc, myb, BCR-ABL, y BCL-2.⁸

b) Expresión de genes supresores tumorales:

Otro ejemplo, que además constituye el más utilizado, sería la introducción mediante un adenovirus de una copia normal del gen supresor tumoral p53, el cual está mutado en el 50% de los tumores en humanos. La toxicidad de Adp53 en células normales es mínima y además, como hemos dicho, un 50% de los tumores humanos son sensibles a los efectos proapoptóticos de p53. Tras la realización de numerosos ensayos en cáncer de pulmón, cabeza y cuello y cáncer de ovario, se objetivó una falta de respuesta de la terapia génica como agente único en fases iniciales. Sin embargo, debido a su actividad proapoptótica, quimio y radiosensibilizante se empezó a utilizar en combinación con quimioterapia en las fases II y III. En el cáncer de pulmón, la evidencia de actividad terapéutica no ha podido confirmarse en ensayos en fase II. En el cáncer de ovario se mostró que incluso podría aumentar la morbilidad del tratamiento con quimioterapia. Las causas de esta falta de eficacia terapéutica podrían ser la transducción incompleta del tumor, la selección de células que carecen de receptores para la entrada del vector, alteraciones en la vía de apoptosis posteriores a la acción de p53 o independientes de p53, expresión de mutaciones dominantes de p53 en el tumor o la presencia de anticuerpos que neutralizan el vector. La mayoría de los resultados preclínicos han sido satisfactorios y han mostrado eficacia antitumoral de p53, sin embargo, esto sólo ha sido constatado en modelos tumorales murinos.¹⁴

La eficacia de esta terapia se vería incrementada si utilizásemos al mismo tiempo un conjunto de vectores que contuviesen cada uno un tipo de gen supresor tumoral o vectores que transportasen varios genes supresores tumorales que simultáneamente corrigiesen las alteraciones acumuladas en las células del tumor.⁸

c) Genes tóxicos o activadores de profármacos:

Para llevar a cabo esta estrategia tenemos dos opciones, utilizar genes que codifican para toxinas como la ricina, la toxina diftérica, etc. cuya elevada toxicidad requiere un control transcripcional muy selectivo difícil de conseguir, o utilizar genes cuyos productos proteicos metabolizan un profármaco inactivo en un fármaco citotóxico.

En cuanto a esta segunda opción se han llevado a cabo ensayos clínicos que utilizaban diferentes profármacos y diferentes enzimas (fabricadas gracias al gen

introducido). Por ejemplo, la introducción mediante un retrovirus del gen que codifica para la cinasa de timidina (enzima) que fosforila el ganciclovir (profármaco) que ha sido administrado por vía sistémica, lo que permite su incorporación al ADN celular, la detención de la replicación celular y finalmente la muerte celular. Sin embargo, se ha observado la presencia de efectos colaterales, como es que las células adyacentes que no reciben el gen puedan recibir el ganciclovir fosforilado a través de uniones intercelulares tipo GAP y por tanto suponga su muerte también. Además, también se ha comprobado que para que esta estrategia tenga eficacia terapéutica se requiere unos niveles de transducción más elevados de los que se han conseguido hasta el momento. Para mejorar estos resultados se han usado otros genes que producen metabolitos más pequeños que difunden mejor que el ganciclovir-trifosfato y que además dañan el ADN sin necesidad de replicación celular. Un ejemplo de esto sería la nitrorreductasa de *Escherichia coli* activadora del profármaco dinitrobenzamida CB1954. Para que la acción tóxica se produzca específicamente en el tumor el vector se administra intratumoralmente o se utilizan promotores selectivos del tumor para controlar la expresión del gen. Por ejemplo, el promotor de HER2, que se sobreexpresa en un 20% de los tumores de mama, se ha utilizado para controlar la expresión de la citosina deaminasa. La función de esta enzima es hidrolizar la 5-fluorocitosina a 5-fluorouracilo, que a su vez inhibe la síntesis de ADN y ARN en la fase S del ciclo celular. La utilización de esta estrategia ha evidenciado regresiones de los nódulos de mama inyectados en 2 de 12 pacientes. Sin embargo, en 6 pacientes el nivel de transducción de los nódulos inyectados no llegó a un 30% de las células del tumor, evidenciando la dificultad de llevar el gen a un número significativo de células tumorales, incluso por inyección directa. La administración sistémica para el tratamiento efectivo de la enfermedad metastásica supone todavía un reto mucho mayor.

d) Inmunoterapia génica contra el cáncer:

Otra de las estrategias cuyo objetivo es la destrucción del tumor consiste en la estimulación del sistema inmune específicamente contra las células tumorales. Para ello podemos utilizar los genes que codifican para citocinas (IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ , etc), moléculas de membrana que participan en la coestimulación de los linfocitos específicos (B7.1, CD40, ICAM-1, etc) o el propio antígeno tumoral a modo de vacuna (alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, MAGE-1, MUC-1, MART-1, etc). Tras la utilización de estos genes se evidenció la aparición de linfocitos citotóxicos anti-tumorales. Sin embargo, la respuesta a esta terapia no fue muy eficaz, esto se debía a que la célula tumoral se hacía resistente debido a la pérdida de expresión de moléculas de histocompatibilidad (CMH), de antígenos tumorales, de otras moléculas que participan en la interacción entre la célula diana y el linfocito y debido a la expresión de proteínas (IGF-1, TGF-B, etc) que inhibían la acción del linfocito. Los tumores que mejor respuesta han mostrado frente a la inmunoterapia han sido el melanoma y los carcinomas renales.¹⁴

Además de este tipo de inmunoterapia, también se está estudiando la posible utilización de toxinas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las células tumorales, es decir, lo que llamaríamos inmunotoxinas. Para conseguir la eliminación completa de un tumor todas las células neoplásicas deberían estar expuestas a una cantidad suficiente de inmunotoxina pero hacerlo sin provocar daños en las células normales del individuo. Todo esto supone que la técnica debiera alcanzar una alta especificidad, estabilidad del compuesto y penetrabilidad en la célula diana, además de un efecto celular letal. En un principio, la estructura de la inmunotoxina que se propuso fue la de la inmunoglobulina G unida a una toxina por un puente disulfuro. Una vez dentro de la célula diana, el puente disulfuro se reduce, liberando así la toxina. Más tarde, se propuso utilizar tan sólo el fragmento Fab de la inmunoglobulina ya que al ser de menor tamaño penetraba con más facilidad en la célula. Las toxinas más utilizadas hasta el momento han sido la ricina, la toxina diftérica y la exotoxina de *Pseudomonas*.⁴⁸

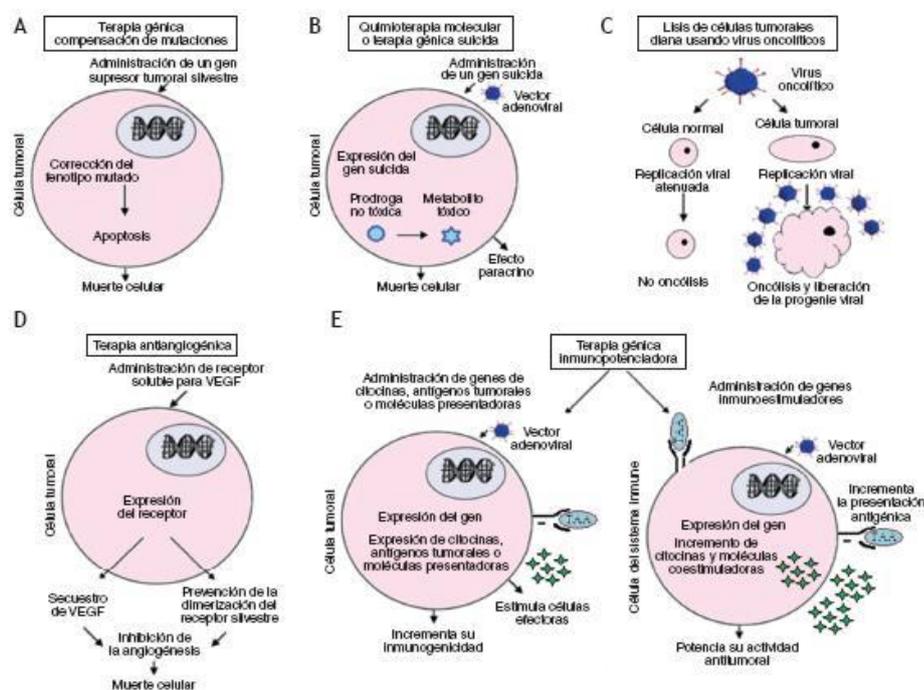


Figura 14. Diferentes enfoques de la terapia génica antitumoral mediada por adenovirus⁴⁷

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana es un virus ARN perteneciente a la familia de los retrovirus, en concreto a los lentivirus. Existen dos tipos de virus, el VIH-1, que es el responsable de la mayor parte de los casos de enfermedad en nuestro medio y el VIH-2, que presenta mayor homología evolutiva con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), produce una infección menos agresiva y está más presente en zonas como África subsahariana.

Una vez se ha producido la infección por cualquiera de los tres mecanismos posibles (vía sexual, parenteral o vertical), se produce la invasión de las “células diana del VIH” que son aquellas que presentan en su superficie el receptor CD4, es decir, los linfocitos T-CD4⁺, los macrófagos y las células dendríticas. Para que el virus penetre en la célula huésped es necesaria la unión simultánea del receptor CD4 y el co-receptor CCR5 o CXCR4 de las “células diana” con la proteína gp120 de la membrana externa del virus.⁴⁹

Algunos individuos presentan variantes del co-receptor CCR5 que no son reconocidas por gp120 lo que hace que estos sujetos sean resistentes a la infección por el virus, en el caso de ser homocigotos, o presenten una evolución más lenta de la enfermedad, en el caso de ser heterocigotos. Se ha descrito el caso de un paciente, denominado “el paciente de Berlín”, infectado por VIH que desarrolló una leucemia y recibió un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de un donante con esta alteración genética del co-receptor. Al no poder infectar el VIH a estas nuevas células hematológicas, las cargas virales se hicieron indetectables y el paciente, por lo tanto, fue considerado como curado de la infección por VIH.⁵⁰

El VIH presenta una estructura formada por proteínas estructurales, proteínas reguladoras y proteínas accesorias. Las proteínas estructurales son codificadas por el gen *gag* (proteínas p24 y p17), gen *env* (proteínas gp41 y gp120) y gen *pol* (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa). Las proteínas reguladoras son codificadas por el gen *tat*, cuya función es aumentar la transcripción del ARNm viral, y el gen *rev*, cuya función es aumentar el transporte de los ARNm virales al citoplasma. El resto de proteínas accesorias tienen como función aumentar la infectividad del virión. Todas estas partes de la estructura del VIH, junto a los receptores necesarios para la infección celular (CCR5, CXCR4), han sido el objetivo de la terapia génica utilizada en esta enfermedad.⁵⁰

Se ha demostrado la capacidad del ARNi para bloquear el ARNm que codifica para proteínas que forman parte de la estructura del VIH, como son la proteína *rev*, *tat* o *vif*. Así mismo también se ha mostrado útil en el bloqueo de la expresión de los co-receptores del virus en la membranas de las células, como se demostró en un ensayo en el que se utilizó un lentivirus que contenía el ARNpi anti-CCR5 y que iba dirigido frente a linfocitos.¹⁶

- Proteína tat:

La proteína *tat* (por *transactivator*) es imprescindible para la producción de nuevos viriones. Esta proteína se une a una región situada en el extremo 5' del ARN viral llamada TAR (*Transactivator Active Region*) y actúa como un transactivador. En cuanto este extremo del genoma viral ha sido transcrito desde el ADN proviral, la

proteína tat se une a él y promueve su elongación favoreciendo la transcripción del resto de la cadena.

Para bloquear esta proteína se han llevado a cabo dos estrategias. La primera consiste en la síntesis de un ARN antisentido que se corresponde con la región TAR con lo que su unión producirá una inhibición de la función de la proteína tat. La otra estrategia consiste en la síntesis de muchos fragmentos de ARN correspondientes a TAR, lo que actuará de señuelo para disminuir el número de moléculas efectivas de tat que puedan unirse al TAR retroviral.¹⁶

- Rev:

Se han sintetizado diferentes tipos de Rev, pero el más utilizado ha sido RevM10 que contiene una mutación en la región de interacción con proteínas celulares. Presenta algunas características que lo hacen atractivo a la hora de su utilización como son la ausencia de toxicidad celular y la ausencia de producción de respuestas inmunes. En un ensayo clínico en el que se utilizó el gen antiviral *RevM10* se demostró una supervivencia mayor de los linfocitos T CD4⁺, sin embargo, esta ventaja selectiva de la población celular protegida no consiguió una reducción significativa de la carga viral, probablemente debido a la pequeña cantidad de células CD4⁺ transducidas, en torno al 0,1% de las circulantes.¹⁶

- Receptores (CCR5, CXCR4):

La alteración en la expresión de los co-receptores CCR5 y CXCR4, como vimos en “el paciente de Berlín”, podría tener importantes beneficios terapéuticos. Es importante tener en cuenta que la completa anulación de CCR5 no parece asociarse con ninguna inmunodeficiencia, sin embargo, se ha observado que el bloqueo de CXCR4 produce alteraciones graves en la hematopoyesis y el desarrollo cerebral de ratones, aunque su anulación en etapas posteriores al desarrollo podría ser mejor tolerada. Una de las estrategias propuestas para bloquear los co-receptores es la utilización de sus mismos ligandos naturales modificados. Estos ligandos presentan el nombre de “intracinas” y mediante su acción producen una limitación de la entrada del virus a la célula. Otra estrategia para bloquear la expresión de estos co-receptores a un nivel diferente podría ser la mediada por ribozimas. Los ribozimas catalizan el corte de secuencias de ARN lo que puede producir la supresión selectiva de expresión de genes. Sabiendo esto, se llevó a cabo la síntesis de una ribozima que hidrolizaba de manera específica el ARNm de CCR5 lo que resultó en una importante reducción en la expresión del co-receptor CCR5 en la superficie celular.¹⁶

8- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La investigación en terapia génica ha progresado significativamente en los últimos años. Hemos pasado de una fase inicial en la que el escepticismo dominaba la opinión pública a ser sustituida por una fase actual en la que predomina un optimismo cauteloso. Pese a los diferentes problemas encontrados, las técnicas de terapia génica somática se han ido desarrollando y siguen siendo una vía muy prometedora, siempre y cuando los protocolos que se lleven a cabo sigan un estricto control por parte de las comisiones científicas y éticas destinadas a tal fin. Además, es importante que los intereses económicos de las empresas privadas no interfieran negativamente en lo que debe ser una buena praxis de experimentación clínica.⁸

Otro de los puntos que postulan a la terapia génica como uno de los pilares del futuro de la medicina es que podemos considerarla una nueva forma de farmacología que va a ser capaz de adquirir un papel importante en el tratamiento de un gran abanico de enfermedades, las cuales no tienen tratamiento alternativo actualmente. Sin duda, puede ser considerada la mejor alternativa terapéutica ya que ataja el problema de raíz, sin embargo presenta como desventaja su gran complejidad. Este hecho obliga a que quien realice su actividad médica durante el presente siglo XXI, no pueda permanecer al margen del desarrollo de esta nueva prometedora modalidad terapéutica.⁵²

Después de años de investigación y desarrollo, las terapias genéticas se están convirtiendo en una realidad comercial. Varios productos ya han sido aprobados por las autoridades reguladoras europeas (Glybera, Imlygic and Strimvelis). Sin embargo, su aprobación no significa que estos productos estén disponibles para los pacientes o sean pagados por los sistemas sanitarios europeos. Los desarrolladores de terapias genéticas se enfrentan ahora al obstáculo de conseguir convencer a los sistemas de salud de que invertir en sus caros productos supondrá un beneficio a largo plazo para el paciente.⁴

En definitiva, es esperable que la mejora continua de las técnicas utilizadas además del descubrimiento del sistema CRISPR / Cas9, permita hacer realidad las grandes expectativas puestas en la terapia génica. Además también parece ser la gran esperanza para el tratamiento de las enfermedades raras. Los importantes avances logrados en los últimos tiempos en cuanto a desarrollo tecnológico de los vectores y el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las diferentes enfermedades invitan al optimismo y nos permiten aventurar que en los próximos años la terapia génica podría convertirse en el tratamiento de cabecera para estas enfermedades.⁵¹

Sin embargo, una de las mayores preocupaciones es el peligro de lo que se denomina "plano inclinado resbaladizo" (*slippery slope*). Cuando se acepta una técnica siempre se inicia con restricciones y limitaciones, pero luego se da paso a la aceptación paulatina y la eliminación de muchas de las restricciones. El temor es que fácilmente se podría pasar de la terapia génica somática a la terapia génica de mejoría, cuya validez ética es cuestionada. Por todo ello, es de interés global promover una normativa internacional que limite la posibilidad de la manipulación genética sin ningún tipo de restricciones.^{5,53}

BIBLIOGRAFÍA:

¹ Isamat M. Actualización terapéutica: terapia génica. Barcelona: Ferrer/Promedic; 2007. Disponible en: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/isamat.pdf>

² Ronchera-Oms CL, González JM. Terapia génica. En: Farmacia hospitalaria. Tomo 2, Capítulo 6 [Internet]. Disponible en: www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf

³ Ruiz Castellanos M, Sangro B. Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve? [Internet]. Scielo.isciii.es. 2017 [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000100002

⁴ Touchot N, Flume M. Early insights from commercialization of gene therapies in Europe. Genes. 2017; 8(2):78

⁵ Lacadena JR. Terapia génica: Consideraciones éticas. Madrid. Tomo 225, núm. 1123:510-520

⁶ Strachan T, Read, A. Human molecular genetics 4ª ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group, 2011.

⁷ Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995; 270: 475-480.

⁸ Terapia génica de ayer y hoy [Internet]. Ugr.es 2017 [citado 30 Mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/tgdaniel.htm>

⁹ Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 2003; 302: 415-419.

¹⁰ Gene therapy clinical trials worldwide. [Internet] 2017. The Journal of Gene Medicine [citado 26 Mayo 2017]. Disponible en: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

¹¹ Terapia génica - CMC_A_Machado [Internet]. [citado 27 Mayo 2017]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/cmcmfbenavente/4-de-los-trasplantes-a-las-celulas-madre/terapia-gnica>

¹² E. Rodríguez Yunta. Terapia génica y principios éticos. Acta Bioethica. 2003; IX, nº1. Disponible en: <http://www.actabioethica.uchile.cl/index.php/AB/article/viewFile/16819/17516>

¹³ Dara Mohammadi and Nicola Davis, Can this woman cure ageing with gene therapy? [Internet] 24 Julio 2016. The Guardian [citado 27 Mayo 2017]. Disponible en: <https://www.theguardian.com/science/2016/jul/24/elizabeth-parrish-gene-therapy-ageing>

¹⁴ Alemany Bonastre R, Barquinero Máñez J, Ramón y Cajal Agueras S. Terapia génica: realidades actuales y expectativas. Rev Clin Esp 2005; 205(4):178-88

¹⁵ Terapia génica para el Parkinson: resultados 4 años después [Internet]. [citado 30 Mayo 2017]. Disponible en: <https://www.2ti.es/2015/08/terapia-gnica-para-el-parkinson-resultados-4-anos-despues/>

¹⁶ Delgado R y Regueiro BJ. El futuro en la infección por VIH: terapia génica y ARN de interferencia. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005;23 (Supl.2):68-75

¹⁷ Mocellin S, Provenzano M. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. Journal of Translational Medicine, 2004.

¹⁸ CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms, Annual Review of Biophysics [Internet]. Annualreviews.org 2017. [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>

¹⁹ Mojica, F.J.M. & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS Journal* 283 (17): 3162-9.

²⁰ Riprogrammare le cellule staminaliper creare nuovi farmaci [Internet] Itmattino.it 2017 [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: <http://www.ilmattino.it/napoli/cronaca/riprogrammare-celle-staminali-creare-nuovi-farmaci-studio-2005287.html>

²¹ Griesenbach U, Pytel KM, Alton EW. Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. *Hum Gene Ther.* 2015 May; 26(5):266-75.

²² Novelli G, Gruenert DC. Genome medicine: gene therapy for the millennium. *Pharmacogenomics* 2002; 3:15-18.

²³ Aiuti, A. *et al.* Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 360, 447–458 (2009).

²⁴ European Medicines Agency, Strimvelis, EPAR summary for the public, Mayo 2016 [Internet] [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003854/WC500208202.pdf

²⁵ Wikipedia contributors. Strimvelis [Internet]. Wikipedia, The Free Encyclopedia; [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Strimvelis&oldid=769751367>

²⁶ Klug W, Spencer C, Cummings M. Concepts of genetics. 9ª edición. 2009.

²⁷ Bueren JA. Avances de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades monogénicas. 9ª edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana 2010. Disponible en: https://s3-eu-west1.amazonaws.com/farmavet/amgen.es/web/archivos/biotecnologia9/6_Avances%20de%20la%20terapia%20genica.pdf

²⁸ Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000; 288:669-72.

²⁹ Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 363, 355–364 (2010).

³⁰ Chuah MK, Evens H, VandenDriessche T. Gene therapy for hemophilia. *J Thromb Haemost* 2013; 11 (Suppl. 1): 99–110.

³¹ Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*. 2009; 113(4):797-806

³² Nathwani, A. C. *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371, 1994–2004 (2014)

³³ Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med* 2011. 365:2357-65.

³⁴ New research aims to reduce hemophilia costs [Internet]. Campaign.optum.com 2017 [citado 30 Mayo 2017]. Disponible en: <http://campaign.optum.com/content/optum/en/optumrx/pharmacy-insights/new-research-aims-reduce-hemophilia-costs.html>

³⁵ Stein L, Roy K, Lei L, Kaushal S. Clinical gene therapy for the treatment of RPE65-associated Leber congenital amaurosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Mar; 11(3):429-39.

³⁶ Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2005; 12(6):1072-1082.

³⁷ Bainbridge JWB, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C *et al.* Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine.* 2015 May 14; 372(20):1887-1897

³⁸ Acland GM *et al.* Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001. May; 28(1):92-5.

³⁹ G. Le Meur *et al.* Restoration of Vision in RPE65-deficient Briard Dogs Using an AAV Serotype 4 Vector That Specifically Targets the Retinal Pigmented Epithelium. *Gene Ther* 14 (4), 292-303. 2006 Oct 05.

⁴⁰ Schinzel A. Genetics and Genomics in Medicine. *European Journal of Human Genetics.* 2015; 23(5):719.

⁴¹ Colaboradores de Wikipedia. Distrofia muscular de Duchenne [Internet]. Wikipedia, La enciclopedia libre; [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Distrofia muscular de Duchenne&oldid=98212384](https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Distrofia_muscular_de_Duchenne&oldid=98212384)

⁴² Seto JT, Ramos JN, Muir L, Chamberlain JS, Odom GL. Gene replacement therapies for duchenne muscular dystrophy using adeno-associated viral vectors. *Curr Gene Ther.* 2012 Jun; 12(3):139-51. Review.

⁴³ Ramos J, Chamberlain JS. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2015; 3:1255–66.

⁴⁴ Hirst RC, McCullagh KJ, Davies KE. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2005 Dec; 24(3):209-16. Review. PubMed

⁴⁵ Liu X et al. Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol.* 2002 Jan; 20(1):47-52.

⁴⁶ Faust SM, Bell P, Cutler BJ, et al. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *The Journal of Clinical Investigation.* 2013; 123(7):2994-3001.

⁴⁷ M. Raki, D.T. Rein, A. Kanerva, A. Hemminki. Gene transfer approaches for gynecological diseases. *Mol Ther*, 14 (2006), pp. 154-163

⁴⁸ Deyev SM, Lebedenko EN. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application. *Acta Naturae.* 2009; 1(1):32-50.

⁴⁹ Colaboradores de Wikipedia. Virus de la inmunodeficiencia humana [Internet]. Wikipedia, La enciclopedia libre; [citado 16 Mayo 2017]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Virus de la inmunodeficiencia humana](https://es.wikipedia.org/wiki/Virus_de_la_inmunodeficiencia_humana)

⁵⁰ Manual CTO de Enfermedades infecciosas, 9ª ed. Madrid. CTO Editorial, 2015.

⁵¹ AELMHU – Las enfermedades raras y la esperanzadora solución con terapia génica [Internet]. Aelmhu.es, 2017. [citado 30 Mayo 2017]. Disponible en: <http://aelmhu.es/index.php/el-experto-opina/articulos-revision/item/46-las-enfermedades-raras-y-la-esperanzadora-solucion-con-terapia-genica>

⁵² Cavagnari B. Terapia génica: opción terapéutica para neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas [Internet]. Scielo.org.ar [citado 30 Mayo 2017]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000100002

⁵³ Lazo PA. Terapia génica humana: tendencias y problemas. Med Clín (Barc) 1996; 106:469-476.

⁵⁴ Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética en Medicina, 8ª ed, Barcelona: Elsevier España, 2016.

⁵⁵ Bedate CA. Fundamentos para el estudio de los efectos sociales de las investigaciones sobre el genoma humano, Cátedra de Derecho y Genoma Humano, Fundación BBV-Diputación Foral de Bizkaia, Bilbao: Universidad de Deusto; 1995, p. 260-261.

⁵⁶ Jacobson SG et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. Arch Ophthalmol. 2012 Jan; 130(1):9-24.

⁵⁷ Press Release | Investors & Media | Spark Therapeutics [Internet] 2017 [citado 7 Junio 2017]. Available from: <http://ir.sparktx.com/phoenix.zhtml?c=253900&p=irol-newsArticle&ID=2234931>

⁵⁸ Rose D. A Leap Forward: Spark Therapeutics Seeks FDA Approval for its Vision-Restoring Gene Therapy - Eye on the Cure [Internet]. Blindness.org. 2017 [citado 7 Junio 2017]. Disponible en: <http://www.blindness.org/blog/index.php/a-leap-forward-spark-therapeutics-seeks-fda-approval-for-its-vision-restoring-gene-therapy/>

⁵⁹ Colaboradores de Wikipedia. Utrophin [Internet]. Wikipedia, La enciclopedia libre; [citado 7 Junio 2017]. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/wiki/Utrophin>

⁶⁰ Hemophilia B Gene Therapy AMT-060 Granted PRIME Status in Europe [Internet]. Hemophilia News Today. 2017 [citado 7 Junio 2017]. Disponible en: <https://hemophilianewstoday.com/2017/04/28/hemophilia-b-gene-therapy-amt-060-granted-prime-designation-in-europe/>