

Terapia génica*

Gene therapy

VARGAS, A.M.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia de Granada.18071 Granada. España

RESUMEN

Esta conferencia versa sobre una introducción a la terapia génica. Los mecanismos integrativos en los que se fundamenta la homeostasis en organismos superiores, están basados en la expresión genética específica en distintos tipos celulares. Alteraciones en estos mecanismos como consecuencia de mutaciones o de cambios en la regulación de los patrones de expresión y síntesis de proteínas son la causa de las enfermedades genéticas. La terapia génica es una nueva técnica en desarrollo que está dirigida a combatir las causas primarias de este tipo de enfermedades. Se basa en la administración de genes terapéuticos a las células, tejidos u organismos enfermos. En la conferencia se suman algunos métodos para la dispensación de genes, los tratamientos *ex vivo* e *in vivo* y la terapia de células somáticas o de la línea germinal. Finalmente, se hace una breve disertación sobre los problemas sociales y éticos relacionados con esta nueva estrategia terapéutica.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad, Virus, Distrofia, Cáncer.

ABSTRACT

The lecture was an introduction to gene therapy. The integrative mechanisms underlying homeostasis in complex organisms are based on the cell-specific gene expression. Many diseases occur as a consequence of mutation or to the alteration of the patterns of protein synthesis. Gene therapy is a new developing technique which focus directly on the primary cause of gene disease, delivering therapeutic genes to ill cells, tissues or organisms. Methods for gene dispensation, ex vivo and in vivo treatments, somatic and germ-line therapies are reviewed. An argument was made about social, moral and ethic problems related to this new therapeutic strategy.

KEY WORDS: Disease, Virus, Fibrosis, Cancer.

Bibliid [0004-2927 (1999) 40:1; 25-30]

Excelentísimo Señor Rector de la Universidad de Granada, excelentísimas e ilustrísimas autoridades académicas, queridos compañeros, señoras y señores:

Es para mí un gran honor, además de un extraordinario placer poder participar en este acto impartiendo la conferencia que he titulado "Terapia Génica". El organismo humano es un sistema de precisión absoluta que funciona por múltiples y, muchos de ellos, ignotos mecanismos homeostáticos. Desde las funciones más

sencillas a las más complejas están absolutamente coordinadas de forma integrada entre las distintas células del cuerpo, todo ello regulado por los patrones genéticos de desarrollo, diferenciación, proliferación y expresión que vienen inscritos en nuestro material genético.

Con la salvedad de las células germinales, todas las células nucleadas contienen esencialmente la misma información genética, sin embargo, la especialización y diferenciación que tiene lugar durante el desarrollo hace que cada

* Conferencia pronunciada en los Actos de la Festividad de la Patrona de la Facultad de Farmacia de Granada el 8 de diciembre de 1998.

tipo celular silencie algunos genes, mientras que otros grupos génicos son expresados específicamente. De aquí surge la multiplicidad celular y tisular que compone nuestro organismo. Podemos definir el estado de salud como aquel en que cada una de nuestras células está funcionando de forma correcta en sincronía con las demás células del cuerpo. Un mal funcionamiento de una única célula puede dar lugar a un estado mórbido de mayor o menor gravedad.

Podemos preguntarnos: ¿Cómo realizan sus funciones las células eucariotas? Hoy, la Ciencia puede dar muchas respuestas. Básicamente, cada célula constituye una compleja maquinaria que expresa su información genética sintetizando moléculas que actúan como herramientas para los intercambios de materia y energía con su entorno, cumpliendo con su programa vital. Estas herramientas son en su mayoría proteínas y también, algunas moléculas de ácido ribonucleico, RNA. Su síntesis está por completo determinada en los cromosomas, constituidos por ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas.

Otra pregunta que debemos hacernos es ¿Cómo células tan diferentes de nuestro organismo pueden actuar de una forma tan precisa y coordinada, cumpliendo fielmente sus programas genéticos? A lo largo de la evolución se han ido desarrollando mecanismos de integración que van desde los más simples, poros en la membrana plasmática que permiten un intercambio directo de moléculas con las células vecinas, hasta los más complejos, sistemas nervioso y hormonal. De la misma manera estos sistemas integrativos están basados en la expresión diferencial de proteínas codificadas en el material genético.

En general, quizás con la única excepción del trauma, las enfermedades surgen como consecuencia de la pérdida o alteración de los mecanismos de coordinación celular o por un inadecuado funcionamiento metabólico, bien sea por causas infecciosas, nutricionales o por la expresión de proteínas que no cumplen de una forma precisa su función. En muchas ocasiones, la enfermedad tiene como causa primaria la acumulación progresiva de alteraciones en la composición del material genético, es decir, la mutación.

Las mutaciones son las causas de las enfermedades genéticas porque alteran la propia identidad de nuestras herramientas celulares, las proteínas, o porque modifican sus concentraciones intra- o extracelulares y, por ende, los patrones

metabólicos o las funciones de coordinación celular. Las mutaciones pueden ocurrir en células somáticas, afectando al individuo portador, o en células germinales por lo que afectarán a toda la progenie. No debemos caer en la fácil tentación de creer que la mutación es maligna. No se puede menospreciar el hecho de que la mutación es la base fundamental de la evolución. En general, ocasiona estados mórbidos pero ocasionalmente da lugar a individuos con mayores ventajas biológicas, lo que hace que a largo plazo la mutación se fije en la población.

Si la base de las enfermedades genéticas está en la composición del DNA, una vez que se aprende a manipularlo, surge inmediatamente la idea de restituir los genes defectuosos con genes sanos y, por tanto, se empieza a hablar de terapia génica.

En los años 70 ya se habían asentado las bases metodológicas para manipular el DNA y empiezan a surgir ideas especulativas sobre la terapia génica (Aposhian, Osterman, Wade, Anderson, Shapiro y tantos otros insignes científicos). En la siguiente década, el número de trabajos de base se incrementa y se establecen los principios para los tratamientos. En la década de los 90, los trabajos sobre este tema se cuentan por miles y comienzan a aparecer los primeros ensayos clínicos, además de multitud de trabajos básicos, esenciales para aportar los elementos científicos que harán posible el desarrollo de la terapia génica para tratar diferentes enfermedades.

¿Qué nos depara el siglo que viene? Estoy convencido de que en los años venideros la terapia génica será una técnica habitual y que se desarrollarán multitud de medicamentos cuyos principios activos serán genes encaminados a curar definitivamente las enfermedades genéticas. Este convencimiento ha sido el que me ha motivado a elegir este tema con la idea de dar una visión general del mismo, ya que los nuevos licenciados se verán necesariamente involucrados en él.

Uno de los principios en los que se fundamenta la terapia génica es el conocido proverbio chino: *Para ayudar a un hambriento no le ofrezcas un pez, dale una caña de pescar y enséñalo a usarla*. Pensemos en una enfermedad muy común y conocida, la diabetes tipo 1, en la que hay destrucción de células α pancreáticas y, por tanto, pérdida de la capacidad de sintetizar insulina. Los pacientes se hacen absolutamente dependientes

de un suministro exógeno de la hormona. Si fuésemos capaces de suministrar a estos pacientes el gen de la insulina, en células pancreáticas o incluso en otros tipos celulares, y que éste se expresase en respuesta al incremento de la glucemia, habríamos resuelto el problema con un único tratamiento terapéutico.

Hay que pensar que esta aproximación puede realizarse con multitud de enfermedades genéticas que afectan a un único gen mutado: Fenilcetonuria, hipercolesterolemia familiar, fibrosis quística, enfermedades lisosómicas, deficiencia en adenosina desaminasa, distrofia muscular de Duchenne y tantas otras.

En la actualidad conocemos todos los genes implicados en estas enfermedades, sus secuencias de bases, las mutaciones responsables, podemos manipularlos pero el gran problema, aún sin resolver, es encontrar el modo de aplicación de los genes para que cumplan su misión terapéutica.

Básicamente hay cuatro métodos de dispensación de genes al interior de las células: Mediante virus, lipogenes, DNA desnudo y microinyección. El empleo de virus ha sido la forma más estudiada pues aprovecha su capacidad esencial, los virus son estructuras nucleoproteicas especializadas en la introducción de material genético en las células a las que invaden. Por otra parte, las células son capaces de fagocitar liposomas que son estructuras lipídicas de doble membrana en las que se ha englobado diverso material, este material puede ser el DNA de interés y entonces podemos hablar de lipogenes. Las células pueden también fagocitar el DNA desnudo, principalmente en presencia de sales, de Ca^{++} . Por último, en células de tamaño adecuado se puede proceder a la microinyección del material genético deseado. Esta técnica puede ser de utilidad para manipular el ovulo o el cigoto.

Una vez que los genes terapéuticos se encuentran en el interior celular, deben ingresar en el núcleo y allí integrarse en los cromosomas para poder ser transmitidos a las células hijas, salvo que se introduzcan en construcciones que den lugar a cromosomas artificiales, con capacidad de replicación y de segregación a la progenie.

Muy brevemente voy a exponer algunas de las características que hacen a los virus herramientas útiles para la terapia génica. Los virus están constituidos por un núcleo de material genético, RNA o DNA, recubierto por proteínas

formando una nucleocápsida que, a su vez, puede estar cubierta por otras estructuras de membrana en las que hay integradas proteínas específicas que facilitan su reconocimiento para la invasión. Algunos tipos de virus están adaptados para la integración de su material genético en los cromosomas de las células infectadas, retrovirus, adenovirus asociados, herpesvirus. Otros, como los adenovirus, no lo integran. Algunos virus tienen capacidad para infectar todo tipo de células, otros, por el contrario, tienen una acción selectiva sobre tipos celulares concretos, vg. algunos herpesvirus, como el herpes simple, infectan selectivamente células nerviosas. El objetivo que hay que lograr es poder utilizar uno u otro tipo de virus aprovechando sus ventajas particulares y, al mismo tiempo, minimizando sus inconvenientes.

Nosotros podemos manipular a los virus. Por ejemplo, si requerimos que un virus infecte un tejido concreto, podemos manipular su material genético e insertarle información para que exprese proteínas específicas que sean reconocidas exclusivamente por las células del tejido diana que poseen receptores para las mismas. De esta forma, un virus manipulado genéticamente se puede convertir en un misil capaz de dirigir con mucha precisión su material genético a un tejido concreto. Pero la manipulación no se limita a este aspecto. Puesto que los virus originan enfermedades, debemos limitar su capacidad invasiva y replicativa, de forma que el virus se comporte únicamente como un vector de los genes terapéuticos para dirigirlos e integrarlos selectivamente. Una vez conocido el ciclo vital del virus, su mapa genético, la secuencia completa de su material genético, estamos en disposición de mutilar todos aquellos genes que no nos interesen y sustituirlos por los genes terapéuticos.

La terapia génica tiene por tanto, dos etapas claramente diferenciadas. En primer lugar, se debe preparar el gen terapéutico e incluirlo en el vector adecuado. A continuación, se realiza el tratamiento del individuo afectado.

No pretendo dar una imagen simplista del problema. Si fuera simple, ya estaría resuelto. En cada una de estas dos etapas hay miles de facetas que deben ser contempladas y estudiadas con detenimiento. Hay que conocer perfectamente la enfermedad que pretendemos curar y también el comportamiento del vector utilizado para la

dispensación del material genético, si se requiere la integración del gen en los cromosomas y, si es así, donde se tiene que integrar. Una vez conocidos todos los datos, hay dos tipos de terapias: *In vivo* y *ex vivo*.

En la terapia "*in vivo*", el vector es introducido en el organismo y se le deja hasta que encuentre las células diana, donde liberará el material genético. Para conseguir esto, se están realizando numerosos experimentos en los que se sustituyen las proteínas de la cubierta externa de diversos tipos de virus por proteínas, como hormonas o de otro tipo, que permitan el reconocimiento específico de determinadas células. Si el vector es un retrovirus, la integración del material genético se realizará cuando la célula se divida y desaparezca la membrana nuclear durante la mitosis. Por ello, si se pretende que la terapia sea duradera, se debe procurar realizarla en tejidos en proliferación. La terapia génica en hígado, por este mecanismo, dado que los hepatocitos se dividen a un ritmo muy lento (una o dos divisiones al año), puede requerir una hepatectomía parcial para inducir la proliferación. Un problema adicional causado por los retrovirus es que tienen la capacidad de integrar sus genomas en cualquier parte de los cromosomas, gracias a terminaciones en su RNA llamadas LTRs, esto puede provocar mutaciones en las células diana por interrupción de otros genes o de regiones importantes en el control de la expresión génica.

La terapia "*ex vivo*" es la preferida actualmente en la mayoría de los casos. Se pueden obtener células del paciente que serán cultivadas *in vitro*. En el laboratorio son modificadas genéticamente y posteriormente son reintroducidas en el individuo enfermo, que adquirirá inmediatamente la capacidad perdida de sintetizar una proteína concreta, restableciéndose su estado de salud. Este tipo de terapia evita la diseminación del vector en zonas del organismo donde podría producir otro tipo de lesiones.

Una de las técnicas más prometedoras de terapia génica es el tratamiento de los problemas pulmonares causados por la fibrosis quística. Esta enfermedad genética tiene su origen en un defecto en el gen que codifica a una proteína de membrana que constituye un canal para el cloruro. La proteína defectuosa hace que las secreciones sean muy poco fluidas. Hace pocas semanas hemos asistido, a través de los medios de comuni-

cación, a la búsqueda desesperada de unos pulmones para realizar un trasplante a una niña malagueña que sufría esta enfermedad. Lamentablemente los pulmones no llegaron y la niña murió. En el futuro, otros niños quizás puedan salvarse gracias a la terapia génica. Es muy posible que el "*fibroquistigen*", cuyo nombre obviamente he inventado, esté disponible para su uso en un plazo muy breve de tiempo. La mayoría de los ensayos clínicos en esta enfermedad se han dirigido a tratar los problemas pulmonares y el método de dispensación génica elegido es el uso de liposomas administrados por medio de aerosoles. Este método no permite la inserción del gen terapéutico en el genoma, por lo que será necesaria la aplicación frecuente del tratamiento, ya que las células pierden el material genético no integrado. En este caso, al ser tan fácil la administración del fármaco, no supondrá mayores problemas.

Hay otro principio básico en la investigación actual en terapia génica: *La mejor defensa es un buen ataque*. Este principio tiene validez cuando se trata de combatir infecciones u otro tipo de enfermedades genéticas tan graves y extendidas como el cáncer. Hoy día más del 50% de los trabajos relacionados con la terapia génica están encaminados a combatir esta enfermedad, desde diversas perspectivas.

Una de las técnicas más prometedoras es el empleo de genes suicidas. Se trata de dispensar genes selectivamente a las células tumorales de forma que, cuando se expresen en determinadas situaciones, conduzcan inexorablemente a la muerte celular. Un ejemplo que he preparado para ilustrar este principio es el siguiente: La timidina kinasa es una enzima que cataliza la recuperación de timidina en una vía de recuperación de bases pirimidínicas para la síntesis de DNA. La enzima fosforila muy específicamente a la timidina y produce desoxi-TMP, que posteriormente dará lugar a dTTP necesario para la replicación del DNA. El genoma de los herpesvirus expresa en las células infectadas una proteína semejante, con actividad desoxipirimidina kinasa pero con una especificidad de sustrato muy amplia, tanto que es capaz de fosforilar a derivados como el ganciclovir. Los derivados fosforilados de este fármaco interfieren con la replicación del DNA y conducen a la muerte de las células infectadas. Tanto el ganciclovir como un análogo, aciclovir, se utilizan para el tratamiento de determinadas

infecciones causadas por citomegalovirus, un tipo de herpesvirus.

El gen que codifica a esta enzima de retrovirus ha sido utilizado con éxito en tratamientos experimentales de tumores cerebrales. La estrategia empleada consiste en la administración por inyección en la zona del tumor de células productoras de retrovirus modificados que llevan incorporado el gen de la desoxipirimidina kinasa de herpesvirus. Los retrovirus producidos integran de forma estable el gen en el genoma de las células cancerosas, lo que se ve favorecido por su continua proliferación, no se integran en las células nerviosas, ya que éstas no proliferan. El tratamiento posterior con ganciclovir dirige a las células productoras de retrovirus así como a las tumorales a la muerte celular y por consiguiente, se produce la remisión del tumor.

Otra estrategia también utilizada en el tratamiento del cáncer es la de favorecer la respuesta inmunitaria del enfermo contra las células tumorales. Normalmente, estas células expresan en su superficie proteínas modificadas que deberían de ser reconocidas por el sistema inmune. Por diversas causas, no bien conocidas pero relacionadas con la capacidad de eludir los sistemas de vigilancia inmunológica, el tumor se establece en un tejido. Se puede tomar una biopsia de un tumor y cultivar *in vitro* las células cancerosas. Posteriormente estas células son transfectadas con el gen de la interleukina-2 o de otras citocinas, proteínas que promueven la proliferación y diferenciación de linfocitos, estimulando la respuesta inmunitaria. Cuando las células modificadas sean reimplantadas en el enfermo, no necesariamente cerca del tumor sino en cualquier parte, como la piel o el músculo, liberarán citocinas que despertarán la atención del sistema inmunitario hacia las células productoras dando lugar a un reconocimiento de antígenos tumorales previamente ocultos al sistema inmunitario. Esta activación inmunológica producirá la búsqueda selectiva en todo el organismo de aquellas células portadoras de los antígenos tumorales y, consecuentemente, se podrá producir más fácilmente la remisión tanto del tumor principal como de las metástasis liberadas.

En la mayoría de los tumores se ha observado mutación en antioncogenes como el p53 y el del retinoblastoma. El p53 es "el guardián del genoma" y participa en las rutas que dirigen a

las células a la apoptosis o muerte celular programada cuando los daños en el DNA son irreparables. En más del 50% de los tumores el gen p53 está mutado y es, por tanto, otro candidato para terapia génica. La introducción de copias sanas del antioncogén p53 en células tumorales puede provocar la remisión del tumor, al activarse la vía apoptótica.

En este pequeño paseo que estamos realizando por las bases de la terapia génica no es posible profundizar en muchos aspectos que merecen una atención muy especial. También la terapia génica puede emplearse para combatir otras muchas enfermedades que no he mencionado, tales como enfermedades víricas de tan gran incidencia como el SIDA, a las que se le está dedicando un gran esfuerzo desde perspectivas similares a las que estoy considerando.

Otras enfermedades susceptibles de tratamiento por terapia génica son aquellas que afectan al sistema nervioso. Ya se está trabajando en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, incrementando la producción de dopamina por neuronas de la sustancia negra. Otras técnicas en investigación tratan de frenar las lesiones neuronales producidas por la sobreestimulación que ocurre durante crisis convulsivas o después de un accidente cerebrovascular. Los abordajes experimentales consisten en la introducción de genes que incrementen la producción de ATP en estos momentos críticos, favoreciendo la eliminación de transmisores como glutamato o potenciando la salida de calcio de las neuronas.

La terapia génica, una técnica tan prometedora, está resultando de muy difícil aplicación práctica. Sin embargo, la multitud de posibilidades terapéuticas que se empiezan a vislumbrar y los rápidos descubrimientos y mejoras en las técnicas de dispensación de genes permitirán en un breve plazo de tiempo la rápida curación de enfermedades hasta ahora intratables. No obstante, como sucede con todos los grandes avances científicos, debemos ser cautos por los problemas éticos y morales que la aplicación de esta técnica puede acarrear.

Podemos resumir que las técnicas de terapia génica se dividen en dos tipos fundamentales, en función del objetivo a tratar: Terapia de células somáticas y terapia de la línea germinal. Cuando se tratan las células somáticas no se altera el acervo genético de los individuos, por lo que esta técnica no entraña mayores riesgos para la

población. Muy diferente es el caso del tratamiento de enfermedades directamente en la línea germinal. Multitud de problemas éticos han de ser resueltos. Es evidente que una pareja transmisora de alguna enfermedad hereditaria tenga el deseo y, posiblemente el derecho, de tener una descendencia sana. Pero, debemos considerar que cada día se van descubriendo nuevos genes que afectan a aspectos no relacionados

directamente con la enfermedad. ¿Qué ocurrirá el día que queramos que nuestros hijos, mediante este tipo de técnicas, sean más altos, más guapos, más listos o más inteligentes? Es obvio que estos temas serán objeto de polémica en los años venideros.