HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL DESARROLLO DE TRATAMIENTOS BASADOS EN LA TERAPIA GÉNICA

Trabajo Fin de Grado. Junio 2017
Shilpa Lekhraj Peswani Sajnani
Facultad de Farmacia. UCM

1. INTRODUCCIÓN

La terapia génica se ha definido históricamente como la adición de nuevos genes a las células humanas. El reciente avance en tecnologías de edición del genoma ha permitido un nuevo paradigma en el que la secuencia del genoma humano puede manipularse con precisión para lograr un efecto terapéutico.

La terapia génica es una técnica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente humano para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. Permite modular la expresión de proteínas específicas para el tratamiento de enfermedades tanto monogénicas como alteraciones genéticas adquiridas como cáncer y SIDA, y otras enfermedades multifactoriales como la diabetes y la enfermedad cardiovascular.

En función de la célula diana, existen dos modalidades de terapia génica:

a) ***Terapia génica de células germinales***: consiste en la introducción de un gen funcional en células responsables de la formación de óvulos y espermatozoides, generando cambios en la dotación genética; se transmite a la descendencia.

b) ***Terapia génica somática***: introducción de un gen funcional en células no germinales. Cualquier modificación y efecto se limitará al paciente individual y no será heredado por el descendiente de los pacientes ni por ninguna generación posterior.

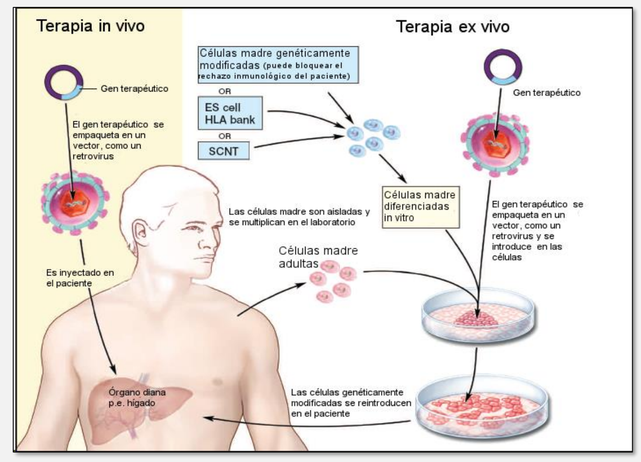

Figura 1. Terapia *ex vivo* vs *in vivo*.

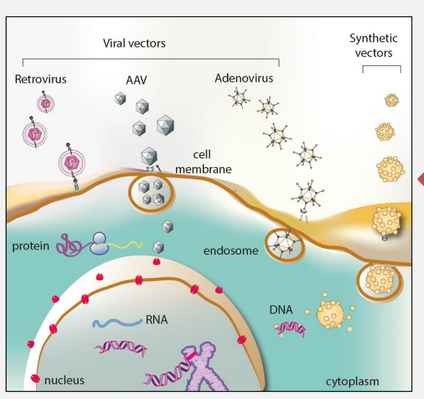

Figura 2. Vectores virales

VECTORES VIRALES	VECTORES NO VIRALES
Retrovirus	ADN Desnudo
Adenovirus	Liposomas
Virus Asociados a Adenovirus	Electroporación
Lentivirus	Bombardeo de partículas
Herpes Simplex Virus	Sonoporación

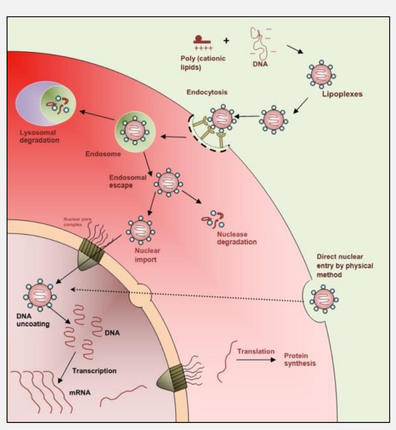

Figura 3. vectores no virales y su mecanismo de acción.

2. OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica sobre el avance en los distintos mecanismos moleculares implicados en terapia génica y las posibles aplicaciones para el tratamiento de enfermedades tanto monogénicas como poligénicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica en el que se han empleado diversos textos científicos referentes al tema de estudio, recogidos en la bibliografía, los cuales se han obtenido de la base de datos de publicaciones científicas MEDLINE (PubMed), Elsevier, Scholar Google, así como de otras web de interés científico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recientes avances en el desarrollo de tecnologías de edición de genomas basadas en nucleasas programables han mejorado significativamente la capacidad de realizar cambios precisos en los genomas de células eucariotas. Una aplicación particularmente atractiva de nucleasas programables, es la posibilidad de corregir directamente las mutaciones genéticas en tejidos y células afectadas para el tratamiento de enfermedades que son refractarias a terapias tradicionales.

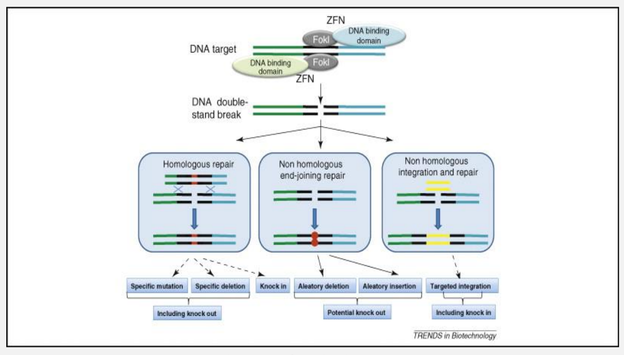

Figura 4. Mecanismo de acción de los ZFNs.

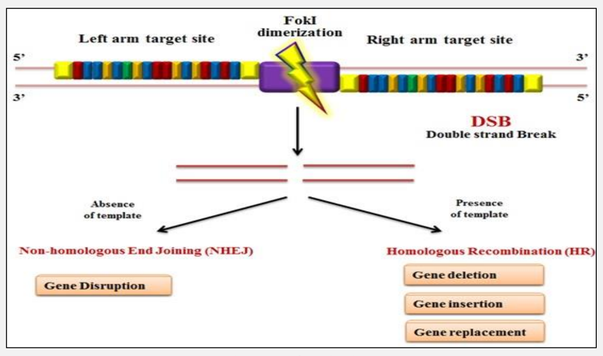

Figura 5. Mecanismo de acción de los TALEN.

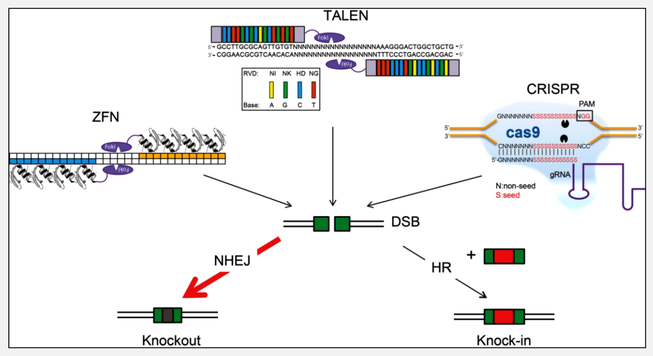

Figura 6. DSBs inducidas por nucleasas programadas en sitios concretos del genoma.

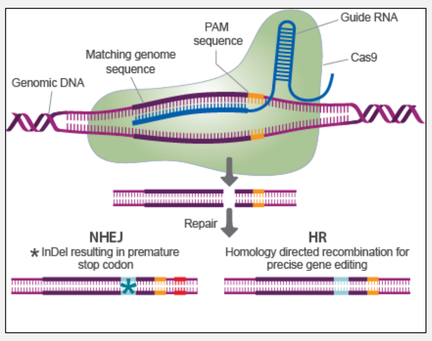

Figura 7. Edición del genoma dirigida a través del sistema CRISPR-Cas9.

	ZFN (Dedos de zinc)	TALEN	CRISPR/Cas9	MEGANUCLEASA
Especificidad	Pequeño número de desajustes de posición tolerados.	Pequeño número de desajustes de posición tolerados.	Múltiples desajustes consecutivos tolerados	Pequeño número de desajustes de posición tolerados.
Restricciones de orientación	Difícil de orientar secuencias no ricas en G.	La base 5' 'debe ser una T para cada monómero TALEN.	La secuencia dirigida debe preceder a un PAM.	El direccionamiento de nuevas secuencias a menudo resulta en baja eficiencia.
Facilidad de ingeniería	Difícil, puede requerir ingeniería extensa de proteínas.	Moderada, requiere métodos complejos de clonación molecular.	Fácilmente re-dirigido usando procedimientos estándar de clonación y síntesis de oligonucleótidos.	Difícil, puede requerir ingeniería de proteínas en grandes cantidades.
Inmunogenicidad	Probablemente bajo, ya que los ZFNs se basan en un andamio de proteína humana. *FokI* se deriva de bacterias y puede ser inmunogénico.	Desconocida, la proteína derivada de Xanthamonas sp.	Desconocida, proteína derivada de varias especies bacterianas.	Desconocida, las meganucleasas pueden derivarse de muchos organismos incluyendo eucariotas
Facilidad de entrega ex vivo	Relativamente fácil a través de métodos como la electroporación y la transducción viral.	Relativamente fácil a través de métodos como la electroporación y la transducción viral.	Relativamente fácil a través de métodos como la electroporación y la transducción viral.	Relativamente fácil a través de métodos como la electroporación y la transducción viral.
Facilidad de entrega in vivo	Relativamente fácil debido al tamaño pequeño de los *cassettes* de expresión ZFN, permite el uso en una variedad de vectores virales.	Difícil debido al gran tamaño de cada TALEN y naturaleza repetitiva del ADN que codifica TALENs, incidiendo en eventos de recombinación no deseados cuando se empaquetan en vectores lentivirales.	Moderado: El Cas9 de S. pyogenes de uso general es grande y puede imponer problemas de empaquetado para vectores virales tales como AAV, pero existen *orthologs* más pequeños.	Relativamente fácil debido al pequeño tamaño de meganucleasas, permite el uso en una variedad de vectores virales.
Aplicaciones	Hemofilia B, HIV, IDCG (inmunodeficiencia combinada grave).	DMD (distrofia muscular de Duchenne), HBV.	DMD, HBV, HIV, Cataratas, Fibrosis quística, Tirosinemia hereditaria.	Infecciones virales, IDCG (inmunodeficiencia combinada grave), Xerodermia pigmentosa.

5. CONCLUSIÓN

- La terapia génica debe considerar cada estrategia y adaptarla al tipo celular que debe ser modificado. No existe una estrategia universal para todos los tipos celulares y todas las condiciones.
- La edición del genoma está progresando rápidamente hacia una era dorada de enzimas fácilmente accesibles y altamente específicas que pueden manipular directamente los sitios genómicos de interés.
- La edición genómica ha cambiado la definición de la terapia de genes y células y ha sido un factor clave en el reciente resurgimiento de este campo, pero todavía hay trabajo fundamental y traslacional importante para poder utilizar estas tecnologías para el tratamiento de enfermedades humanas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cai, M., Yang Y. (2014). Targeted Genome Editing Tools for Disease Modeling and Gene Therapy. *Current Gene Therapy*; 14, 2-9.
2. Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nature Medicine*, *21*(2), 121–131.
3. Gaj, T., Sirk, S.J., Shui, S., Liu, J. (2016). Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.;8(12).
4. Guha, T. K., Wai, A., & Hausner, G. (2017). Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *15*, 146–160.
5. Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy*, *24*(3), 430–446.
6. Misra, S. (2013). Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India*; 61(2):127-33.