

02

3er TRIMESTRE 2013

Ventus

revista digital de alimentación y ciencia

Terapia génica
ENTREVISTA A RICARDO AMILS
Instituto Biomar, S.A.

FUNCIONAMIENTO DEL COMITÉ
DE ÉTICA ASISTENCIAL DE
LA CLÍNICA SANTA MARÍA,
DE SANTIAGO DE CHILE

Agricultura convencional.
Agricultura ecológica.
Agricultura biotecnológica
BIOMARCADORES Y BIOMECÁNICA
Veracetics



02

4^{er} TRIMESTRE 2013

Ventus

revista digital de alimentación y ciencia

Sumario

EDITORIAL 008

ARTÍCULO DE OPINIÓN 010

Terapia génica
Por **ANTONIO TALAVERA**

ENTREVISTA 022

Entrevista a Ricardo Amils
Por **ENRIQUE MARÍN**, Director revista Ventus

EMPRESA 036

Instituto Biomar, S.A.
Por **ANTONIO FERNÁNDEZ**, Consejero Delegado

PRODUCTOS Y SERVICIOS 050

Funcionamiento del Comité de Ética Asistencial de la Clínica Santa María, de Santiago de Chile
Por **MARCELA PAREDES**, Neuróloga Infanto Juvenil y **M^a ALEJANDRA ALJARO**, Odontóloga Infanto Juvenil

INTERNACIONAL 058

Agricultura convencional. Agricultura ecológica. Agricultura biotecnológica.
Por **ENRIQUE MARÍN**, Marín Palma. Consultores en Alimentación y Biomedicina.

INVESTIGACIÓN 078

Biomarcadores y Biomecánica.
Por **FERNANDO BANDRÉS**, Fundación Tejerina

LOS COMIENZOS 090

Veracetics
Por **ISABEL MARTÍNEZ**, Socia Fundadora

EVENTOS 106



EDITOR Y DIRECTOR

Enrique Marín

ASESOR CIENTÍFICO

José Pascual Abad

CORRESPONSALES

Argentina María Emilia Gautero

Brasil Juliana Cardinali

Chile Alejandra Aljaro y Marcela Paredes

Colombia Rosalba Duran

México Marina María de Jesús Romero

Puerto Rico Horacio Serrano-Rivera

DIRECTOR GRÁFICO

Ana M. Marín

EDITA

Editorial Ephemera

Ronda de la Pescadería, 20. 28801

Alcalá de Henares. Madrid

ISSN

2340-8855

CONTACTO

ventus@revistaventus.com

Foto portada: Hongos. Imagen cedida por Instituto Biomar, S.A.

La revista no se hace responsable del contenido de ningún artículo y el hecho de que patrocine su difusión no implica, necesariamente, conformidad con las tesis expuestas. De acuerdo con las disposiciones vigentes, deberá mencionarse el nombre de la Revista en toda reproducción total o parcial de los trabajos contenidos en la misma.

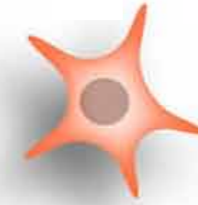
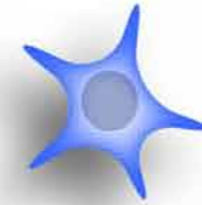
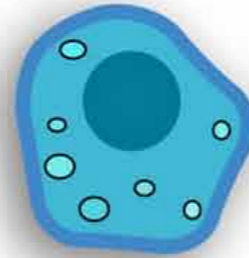
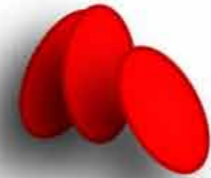
10031

Ventus SUMARIO

Ventus REVISTA DE ALIMENTACIÓN Y CIENCIA

TERAPIA GÉNICA

Antonio Talavera



El término "terapia génica" fue acuñado por Theodore Friedmann a principios de la década de 1970 para referirse a un conjunto de técnicas consistentes en la introducción de genes en tejidos adecuados, con el fin de curar enfermedades hereditarias debidas a deficiencias génicas.

Aunque los componentes fundamentales de la terapia génica (TG) no han variado en su esencia, el concepto de terapia génica no ha dejado de evolucionar desde entonces. La primera variación sustancial fue la transición que sufrió el significado desde "terapia del gen", tal como quería Friedmann, hacia "terapia por medio de material genético", matiz que permitía no solo centrarse en deficiencias heredadas sino también en otras enfermedades, tales como procesos tumorales o infecciones virales.

La TG se funda en el vertiginoso desarrollo que tuvo la genética molecular a lo largo del siglo XX y que culminó con las técnicas denominadas "ingeniería genética" que permitieron el aislamiento, estudio, manipulación y expresión de genes aislados de su contexto. Tras un periodo de desarrollo balbuceante, que no estuvo desprovisto de polémicas, la terapia génica pudo demostrar, ya en 1990, su aplicabilidad cuando unos investigadores franceses lograron curar a dos niñas aquejadas de inmunodeficiencia debida a la falta de adenosina deaminasa (ADA). El gen que codifica este enzima fue suministrado a las pacientes, a las que se siguió durante 5 años antes de publicar los resultados, siendo la curación evidente. La aplicación de la terapia génica ha llevado más tarde a éxitos reconocidos, como fue en el año 2000, la curación, por parte del mismo grupo de investigadores, de 11 niños con un tipo de inmunodeficiencia diferente del anterior, llamado X1 o, en el mismo año, la curación

de tres pacientes hemofílicos. Desde ese momento, la aprobación de protocolos de TG no se ha detenido, de manera que los resultados acumulativos, revisados en julio de 2013 y que aparecen en el sitio Web <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, dependiente de la revista *Journal of Gene Medicine*, dan cuenta de 1.970 protocolos clínicos aprobados desde 1989, 74 de los cuales han llegado a la última fase de experimentación. Las aplicaciones de estos protocolos son muy diversas, desde procesos cancerosos hasta enfermedades oculares, pasando por el SIDA y, naturalmente, enfermedades hereditarias.

A pesar de la sencillez conceptual de la terapia génica, su devenir histórico está plagado de momentos difíciles, debido, en parte, a la precipitación en el desarrollo de los cuatro pilares que la sostienen: el conocimiento de la enfermedad que se quiere curar; el material genético que hay que usar para tal fin (material genético terapéutico o MGT); el tejido donde se debe aplicar tal material genético y, finalmente, el modo de introducir el MGT en dicho tejido.

Enfermedades genéticas, hereditarias o no

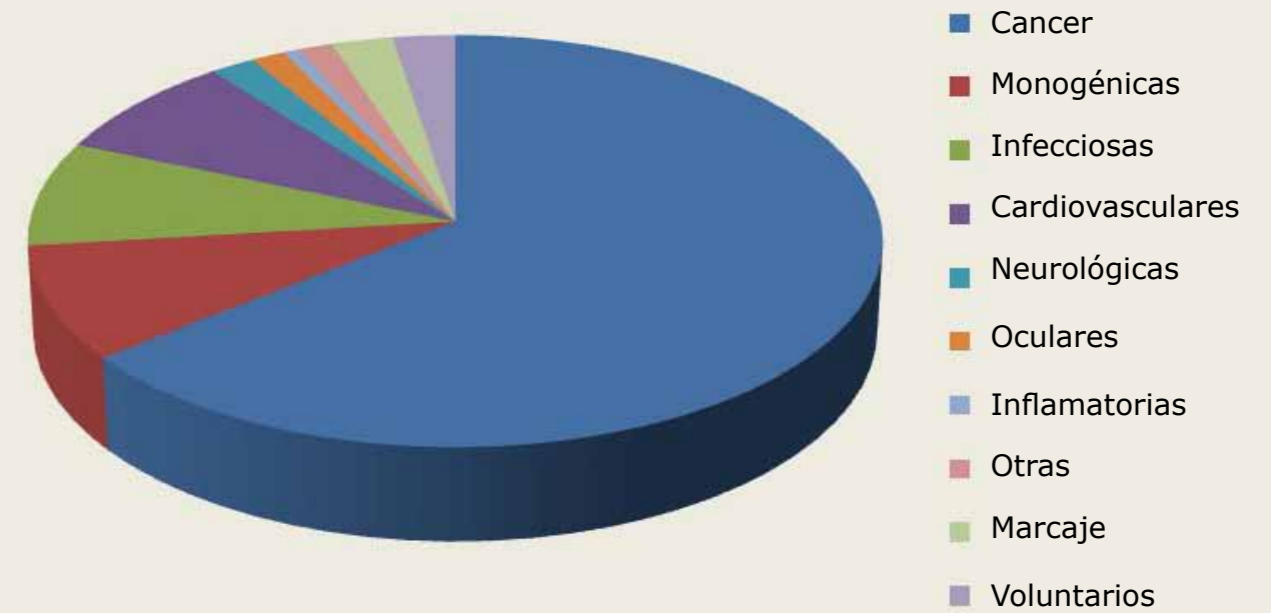
LAS ENFERMEDADES debidas a mutaciones genéticas pueden afectar a uno o a varios genes. En el primer caso reciben el nombre de "enfermedades monogénicas" o "errores congénitos del metabolismo". El catálogo de enfermedades de este tipo aumenta constantemente y puede consultarse en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Uno de los ejemplos más claros y el primero descrito es la fenilcetonuria: en los individuos sanos el aminoácido fenilalanina es convertido en tirosina por la fenilalanina hidroxilasa. El fallo del gen que codifica este enzima determina un excesivo nivel de fenilalanina en el medio interno, lo que provoca un retraso mental en el recién nacido. No todas las enfermedades monogénicas afectan, sin embargo,

a enzimas, sino también a otros tipos de proteínas, tales como puede ser la β globina, cuya ausencia o malfunción da lugar a talasemias o a anemia falciforme, o los factores de coagulación, cuya ausencia determina la hemofilia en sus diferentes variantes. Por otra parte, existen enfermedades en las que el número de genes afectados es múltiple, llamadas por ello enfermedades poligénicas, entre las que se encuentran la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, espina bífida y muchas otras.

Aunque parezca contradictorio, existen enfermedades debidas a mutaciones en genes que, al contrario que las ya citadas, no son hereditarias, ya que dichas mutaciones no afectan a la línea germinal. Un ejemplo de esta situación lo ofrece el cáncer, proceso que es consecuencia de la acumulación de mutaciones somáticas y que determina la pérdida de control del crecimiento celular, junto con otras características que permiten el desarrollo de un tumor maligno. Lo mismo sucede con las infecciones virales, cuyo comienzo es la introducción del genoma del virus en una célula, por lo general somática. Tanto los procesos tumorales como las infecciones virales (por ejemplo, el SIDA) pueden, por lo tanto, ser consideradas como enfermedades tratables por terapia génica. Es precisamente el cáncer el objeto de casi los dos tercios del número de protocolos clínicos de TG registrados hasta el presente (ver figura pagina derecha), dada la importancia médica a nivel global de esta enfermedad, lo que también justifica que los tratamientos del SIDA casi alcancen ya a los referidos a enfermedades monogénicas.

Genes terapéuticos

SIENDO EL MGT el componente cardinal de la TG, la elección del MGT idóneo requiere conocer, en cada caso, la naturaleza y características fisiológicas de la enfermedad. La acción del MGT puede ser variada, ya que, o bien suple la función de un gen defectivo o puede estar destinado a destruir células tumorales o contrarrestar la acción de genes virales.



En el primer caso, típico de la TG de las enfermedades monogénicas, el MGT es la versión correcta del gen mutado. Esto requiere la identificación del mismo, lo que no siempre ha sido inmediato. En el caso de las talasemias, un estudio fisiológico determina que las proteínas ausentes son las globinas, lo que permitió aislar y clonar su correspondiente gen. En el extremo contrario está la fibrosis quística, cuyos síntomas se conocían perfectamente pero no así la proteína defectiva responsable de dichos síntomas. Fue preciso un estudio genético exhaustivo para localizar el gen, clonarlo, secuenciarlo y deducir la estructura de la proteína afectada, que resultó ser un canal iónico presente en las vías respiratorias.

La TG de las enfermedades monogénicas puede realizarse añadiendo al genoma del paciente el gen que "no le funciona" (TG de adición) o sustituyendo éste por el correspondiente gen funcional (TG de sustitución). El primer modo no requiere buscar una localización precisa en el genoma del paciente para el nuevo gen. Ello conlleva, sin embargo, que el gen curativo no se halle en su contexto natural, desaprovechándose todos los mecanismos de control genético que determinan el tejido y el

momento en que el gen se expresa, así como la intensidad de la expresión, amén del peligro que supone que la inserción de un gen exógeno active indebidamente genes endógenos que puedan provocar tumores, como de hecho ha ocurrido. La TG de sustitución no presentaría, en cambio, los inconvenientes apuntados, ya que los mecanismos de control de expresión génica no serían alterados. Esta modalidad está en la actualidad en estudio, siempre dificultado por la baja eficiencia de recombinación homóloga en las células somáticas de mamífero.

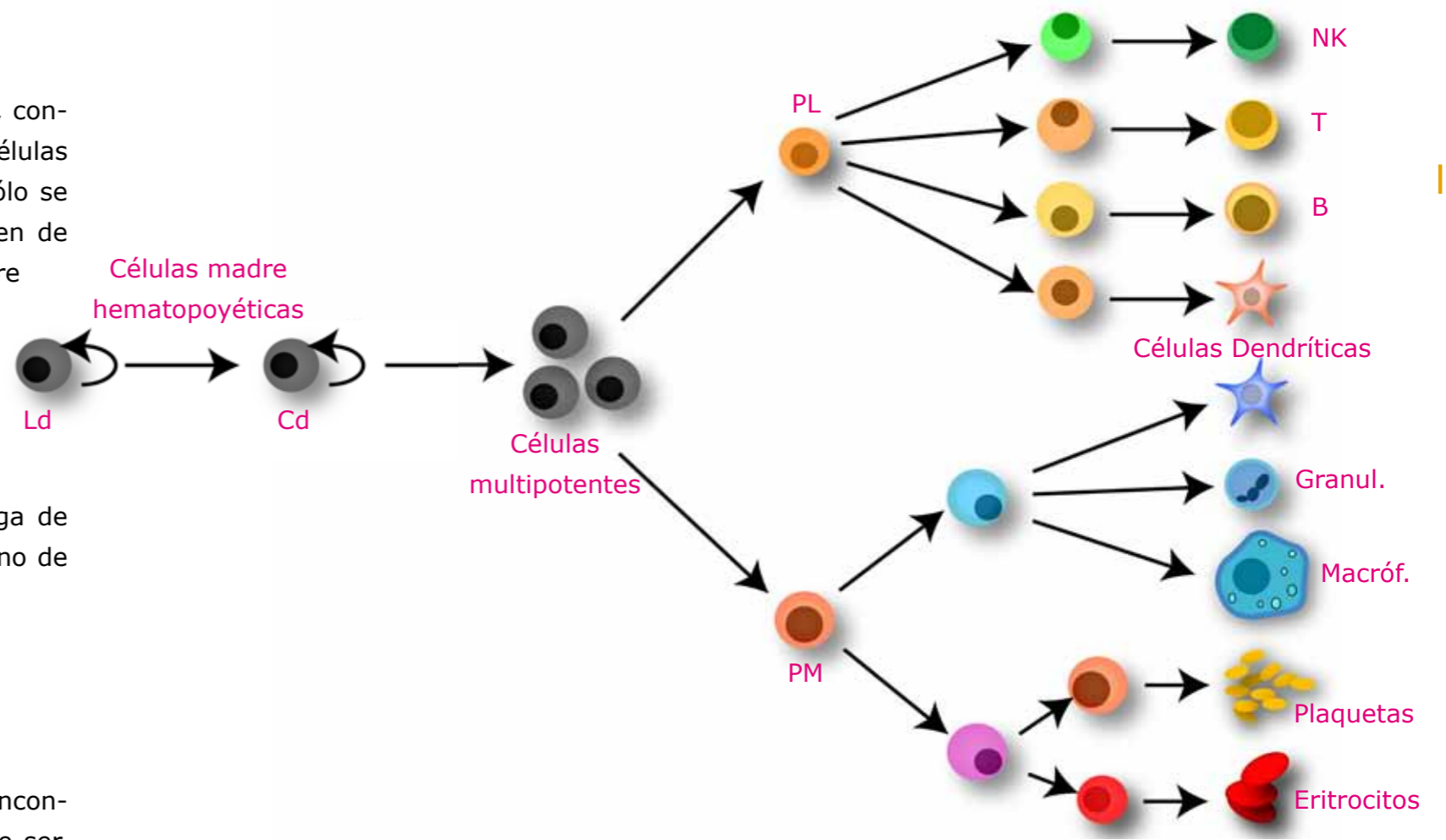
El segundo tipo de genes constituyen la terapia del cáncer llamada "suicida", consistente en la introducción de genes letales dirigidos exclusivamente a las células cancerosas, de manera que, aun cuando alcancen otros tipos de células, sólo se expresen en aquéllas. Tamaña selectividad puede alcanzarse dotando al gen de promotores que sólo sean funcionales en las células tumorales, lo que requiere un previo estudio exhaustivo del tipo de tumor.

El tercer tipo tiene como paradigma la TG del SIDA. El ciclo biológico de este virus muestra una serie de etapas que pueden ser bloqueadas mediante suministro de material genético apropiado. La eficacia de estos tratamientos depende directamente del grado de conocimiento que se tenga de cada una de esas etapas, ya que el virus ha demostrado encontrar, en alguno de estos casos, vías de escape al tratamiento.

Células para expresar los genes terapéuticos

NATURALMENTE, PARA que el MGT se exprese y ejerza su acción, debe encontrarse dentro de una célula. El paso a dar tras la preparación del MGT debe ser, pues, la elección de dichas células que dependerá en gran medida de la naturaleza de la enfermedad a tratar. Se pueden considerar varias posibilidades: una de ellas es el uso de células precursoras. En efecto, muchos de los genes de interés en TG llevan a cabo su expresión en tejidos determinados; por ejemplo, las globinas α y β se producen en los reticulocitos. Esto nos conduciría a introducir el de la β -globina en reticulocitos para combatir una β -talasemia. Sin embargo, aunque se lograra una

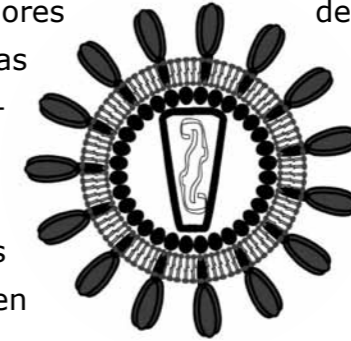
expresión correcta y equilibrada del gen y los eritrocitos procedentes de los reticulocitos tratados contuviesen una hemoglobina plenamente funcional, el éxito de la TG sería tan corto como la propia vida de los eritrocitos, que es de pocos días. Las células idóneas serían, indiscutiblemente, las células madres del sistema hematopoyético (figura adjunta a esta página). En este y otros casos el tejido elegido es el



"natural", y dentro de éste, sus células precursoras. Hoy día se conoce la identidad de muchos tipos de estas células (llamadas células madre adultas para distinguirlas de las procedentes de embriones), que se encargan de reemplazar tejidos tan diferentes como cartílago, hueso, tejido adiposo, músculo esquelético y cardíaco, dermis y epidermis, etc.

En otros casos, como puede ser la hemofilia, el tejido idóneo para introducir el gen funcional del factor de coagulación requerido podría no ser el hígado, como cabría de esperar, ya que dichos factores son producidos normalmente por los hepatocitos. Sin embargo, el hecho de que dichos factores sean excretados y transportados a la sangre permite encontrar tejidos más convenientes, siempre que éstos permitan verter el factor de coagulación al medio interno, posibilidad que es ofrecida tanto por la piel como por el músculo esquelético, tejidos ambos que pueden ser explantados, cultivados, modificados genéticamente con el gen terapéutico, y reimplantados en el paciente de forma mucho más eficiente que el tejido hepático.

virales necesarios para fabricar cápsidas, (manipulados convenientemente para que no puedan producir virus replicativos); en estas mismas células se introducen, por otra parte, los genomas virales portadores del MGT, que se incorporarán a las cápsidas recién formadas para dar lugar a los virus recombinantes, capaces de transducir el MGT a las células deseadas.

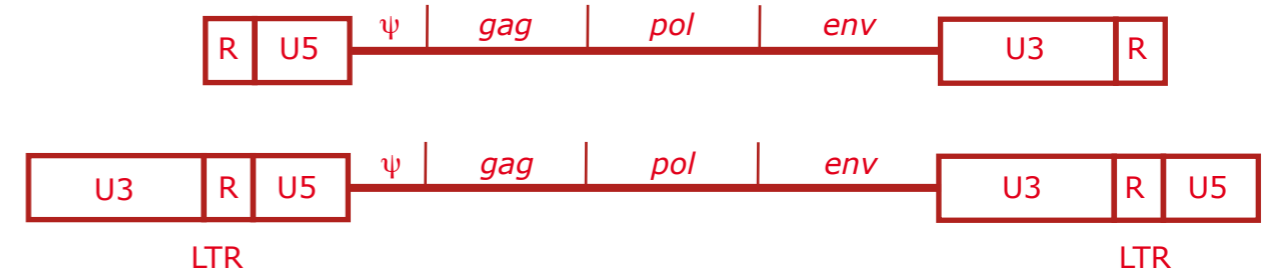


Los vectores de TG desarrollados más basan en Retrovirus. Estos virus poseen una cápsida de unos 100 nm de diámetro, compuesta de una envoltura y una nucleocápsida en el interior de ésta. La nucleocápsida contiene el material genético, consistente en dos moléculas idénticas de ARN de cadena sencilla, que a su entrada en la célula dan lugar a una molécula de ADN de doble cadena (ver siguiente figura).

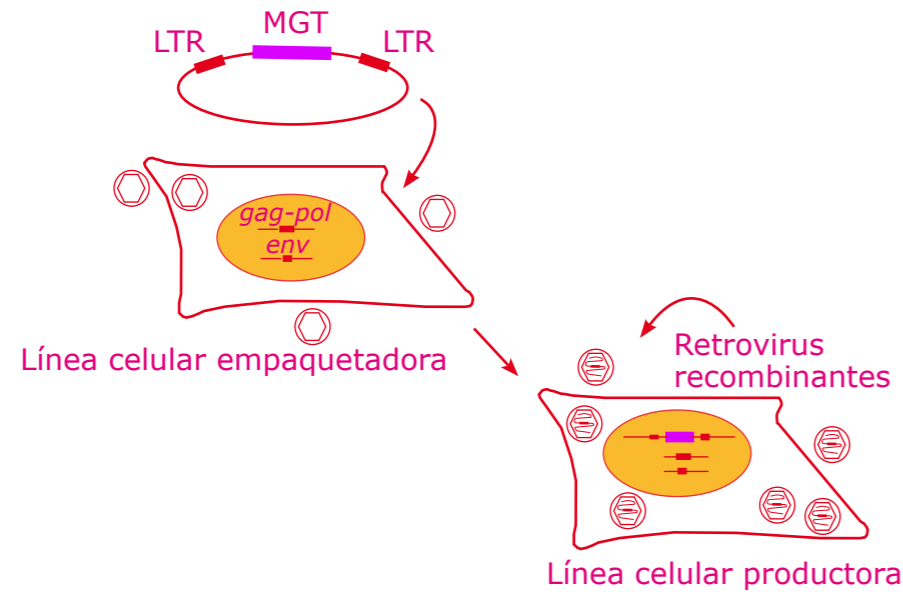
Vehículos para suministrar genes terapéuticos

LOS VEHÍCULOS para transferir genes exógenos a las células (vectores de transgénesis) aplicables a la TG se dividen en dos grupos: vectores virales y no virales. El primer tipo, ya contemplado como ideal por Friedmann, debe su desarrollo al hecho de que los virus son especialistas en la introducción de material genético (el suyo propio) en células, ya que de este proceso depende su supervivencia. Los principales virus empleados como vectores de TG son los retrovirus y adenovirus. El uso de virus como vectores requiere eliminar su capacidad de replicación, Si un virus nos ha de servir para transportar un gen a una célula, el proceso debe terminar ahí, sin que se produzcan nuevos. Por otra parte, necesitamos introducir el MGT dentro del material genético del virus para que éste realice la transferencia del MGT en este caso, denominada transducción. La requerida inserción se hace sustituyendo genes virales esenciales para la replicación del virus, con lo que la propia inserción provoca la requerida eliminación de la capacidad del virus para replicarse. Esta forma tan obvia de "matar dos pájaros de un tiro" no es sencilla, ya que los genes esenciales para la replicación son, entre otros, los que codifican las proteínas de la cápsida, y sin cápsida, no hay transducción posible.

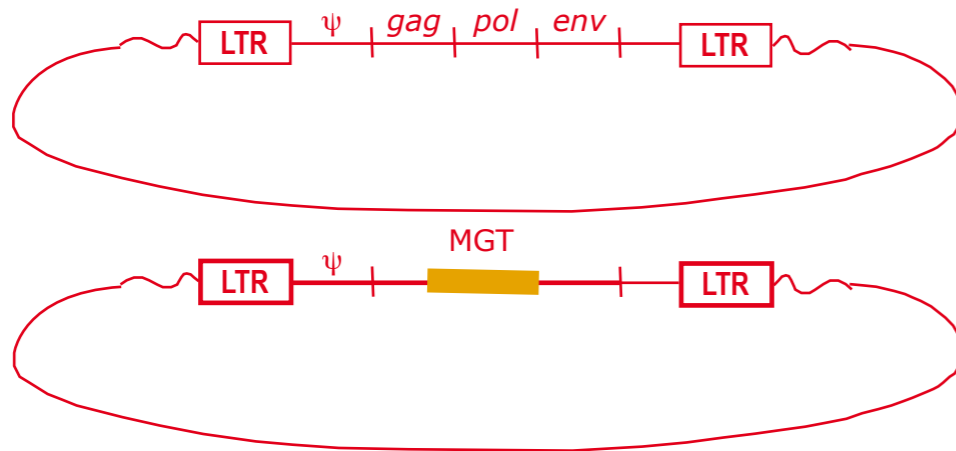
Este "impasse" se soluciona de forma diferente para cada grupo de virus, pero las soluciones presentan características comunes que podemos considerar en este punto: es necesario disponer de células a las que, por una parte, se dota con los genes



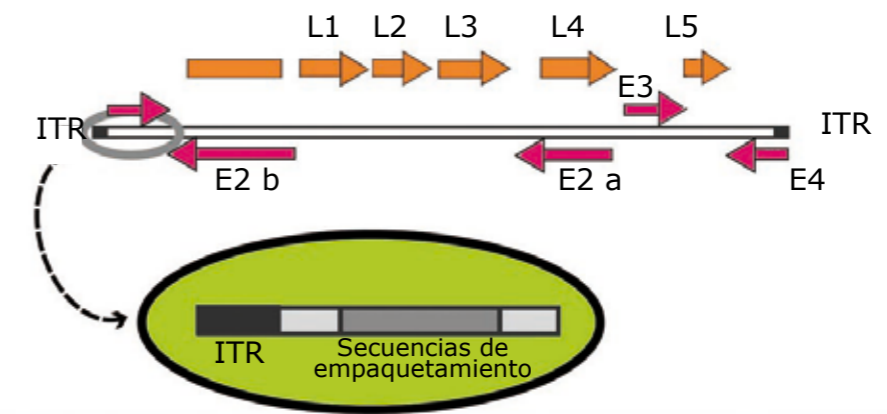
Los retrovirus tienen dos características esenciales para ser buenos vectores: la primera es su simplicidad genética, ya que sólo poseen tres genes que dan lugar a proteínas de la cápsida y de la envoltura. Estos genes son contiguos en el genoma, lo que facilita la tarea de su eliminación sin tocar otras regiones que son imprescindibles para que estos virus funcionen como vectores. La segunda característica es el hecho de que el ADN viral se integra en el ADN celular, con lo que los genes aportados (los genes virales en los virus completos, o el MGT en los vectores) son transmitidos a las células hijas. La producción de retrovirus recombinantes (figura página siguiente) se lleva a cabo en células empaquetadoras, portadoras de los tres genes citados. Estas células producen, por lo tanto, cápsidas vacías en ausencia de otra manipulación. Cuando en las mismas se introduce material genético viral en el



cual los genes esenciales han sido sustituidos por el MGT (figura de abajo), se comenzarán a producir cápsidas llenas del material genético recombinante. Este tipo de vectores exhibe el mérito de haber sido el utilizado por el grupo de Cavazzana-Calvo en la curación de niños con Inmunodeficiencia a que más arriba hemos aludido. En la actualidad han sido utilizados en 455 protocolos clínicos, es decir, el 22.4% de los 1 970 protocolos registrados hasta la fecha.



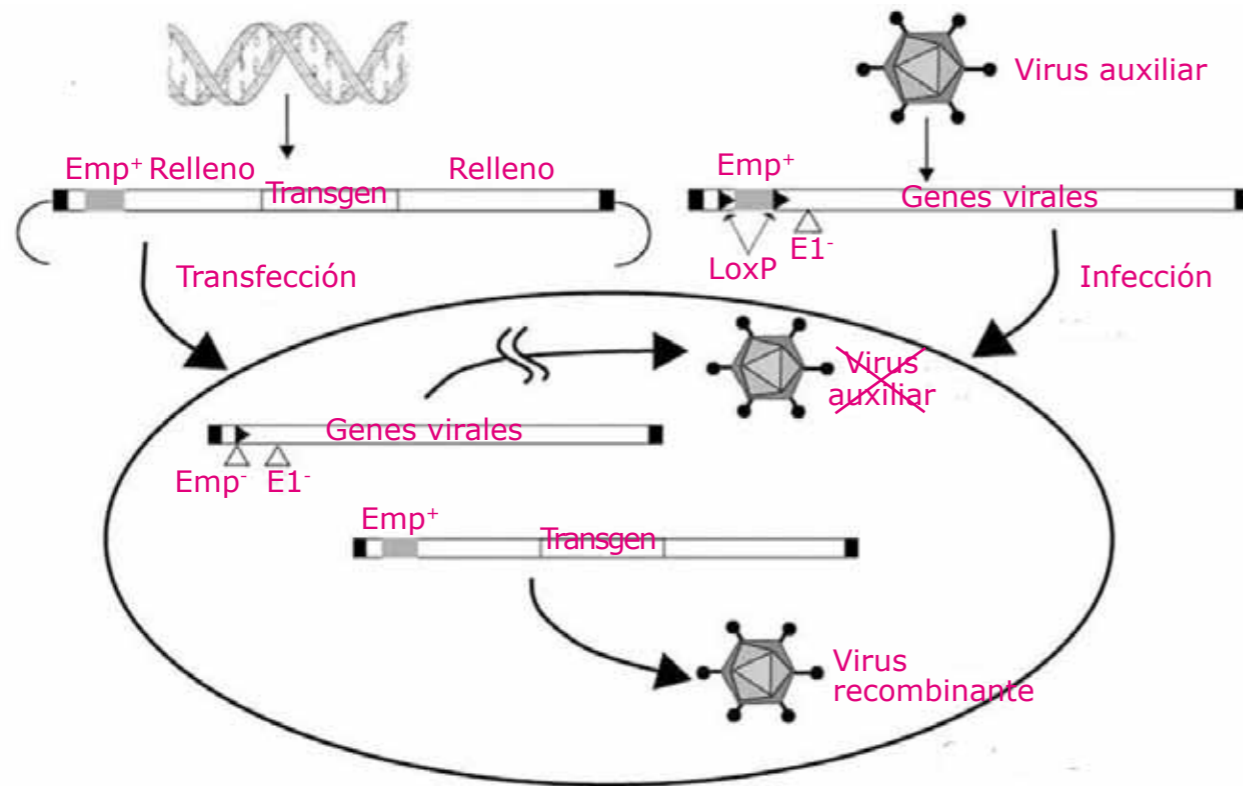
Los vectores retrovirales han sido durante un tiempo los más utilizados en protocolos clínicos de TG, pero actualmente han sido sobrepasados por vectores basados en adenovirus (476 protocolos, es decir el 23.5%). Estos virus, responsables de enfermedades respiratorias de vertebrados, y cuya cápsida es icosaédrica, no pre-



sentan envoltura. Su material genético es una molécula de ADN de cadena doble, de unos 36.000 pares de bases cuyo extremo presenta repeticiones terminales invertidas (ITR) (figura superior), seguidas de una región de encapsidación del ADN. La parte estructural del genoma contiene cinco grupos de genes que se expresan antes de la replicación del ADN (genes tempranos) y cinco grupos de genes tardíos, posteriormente a aquélla.

Siendo el genoma de los adenovirus relativamente complejo, la preparación de virus transductores requiere de técnicas más complejas que en el caso de los retrovirus. En los adenovirus de última generación se utilizan unas células, llamadas Cre+, en las que se introduce un plásmido en el que la práctica totalidad de los genes adenovirales ha sido sustituida por el MGT, que queda flanqueado por ambas ITRs y la zona de empaquetamiento. Seguidamente, las células son infectadas por un adenovirus que aporta un ADN viral completo, cuya zona de empaquetamiento está flanqueada de unas señales especiales, denominadas LoxP, de manera que las células Cre+ provoquen recombinación entre ellas, eliminando así la zona de empaquetamiento de este ADN que, por otra parte es quien aporta todos los genes necesarios para la producción de cápsidas en las que sólo se puede empaquetar el ADN portador del MGT (ver figura página siguiente)

A estos tipos de virus se suman otros, tales como Poxvirus (256 protocolos), virus adenoasociados (105), Herpesvirus (62) y replicones basados en Alfavirus (3). A lo largo de la historia de la TG se han ido desarrollando, además, sistemas no basados en virus, que utilizan compuestos que forman complejos con el ADN y facilitan



su entrada en la célula por endocitosis. Un refinamiento de esta técnica consistiría en la adición a estos complejos de elementos de ligandos virales, que permitan el direccionamiento del MGT a tejidos predeterminados, lo que ha llevado a los especialistas en esta materia a hablar de "virus artificiales".

Futuro de la terapia génica

AUN CUANDO la TG ha sido objeto de controversia en los más de 40 años transcurridos desde su concepción teórica, primero por el uso de virus potencialmente patógenos, y luego por el fallecimiento, ocurrido en 1999, de un paciente (por rechazo inmunológico del vector, que no al efecto del MGT en sí), el gran esfuerzo puesto en la optimización tanto de los vectores como del propio MGT, y el conocimiento cada día más detallado de las enfermedades que son un posible objetivo de la TG, determinan que el futuro de la TG pueda ser visto con optimismo, aun cuando su desarrollo inmediato solo produjera, en lo sucesivo, resultados sin espectacularidad digna de las portadas de las revistas científicas, ni mucho menos de los grandes rotativos.

ANTONIO TALAVERA es Doctor en Biología por la Universidad Complutense y Científico Titular del CSIC. Ha desarrollado su actividad científica en el Centro de Biología Molecular, siendo su objeto principal de estudio el desarrollo de vectores de terapia génica basados en retrovirus y dirigidos a la terapia génica de sustitución. Entre los años 1998 y 2008 impartió el Curso de Doctorado "Terapia Génica" en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, lo que le llevó a la publicación del libro "Terapia Génica" (Ed. Ephemera, 2004). Su pertenencia a la Sociedad Española de Virología desde su fundación, y de la cual ha sido Secretario durante seis años y hasta su jubilación en 2013, se plasmó en la publicación del, hasta ahora, único libro de divulgación de la Virología en castellano "Virus salvajes; virus domesticados" (Ed. Aldevara, 2008).

