

Terapia Génica en Dermatología*

Jennifer Frias, Erika Páez, Luis Briceño, Raquel Vargas Hurtado

Universidad Central de Venezuela, Hospital Vargas, Instituto de Biomedicina, Caracas-Venezuela. jennimed@hotmail.com
 *Trabajo Ganador del Premio Foro "Dr. Juan Di Prisco", 2010

Resumen:

Posterior al descubrimiento del genoma humano, los estudios se ven enfocados en investigar no solo la patogénesis de las enfermedades, sino que van más allá buscando caracterizar las bases moleculares y aberraciones genéticas de las mismas, con el fin de tratar no solo la consecuencia de la patología sino su causa. Es así como surge la terapia génica, siendo una herramienta terapéutica en la cual se manipula y transfiere información genética de las células de un individuo; ya sea para introducir una nueva función, restablecer una función celular que estaba abolida o defectuosa, o interferir con una función ya existente. Esta terapia inicialmente fue concebida para tratar enfermedades con alteraciones monogénicas, pero en la actualidad sus buenos resultados dan pie para realizar investigaciones en diversos campos clínicos e inmunológicos, en procesos degenerativos neurológicos, enfermedades cardiovasculares y metabólicas; otras aplicaciones de la terapia génica se basan en combatir múltiples procesos neoplásicos y enfermedades causadas por virus, como el Sida. En el campo de la dermatología, se considera imperativo el hecho de buscar soluciones en aquellas patologías con tratamientos paliativos o cuyos esquemas terapéuticos convencionales no son efectivos, afectando severamente la calidad de vida del paciente, como son los melanomas metastásicos y epidermolísis ampollar entre otras.

Palabras clave: terapia génica- enfermedades genéticas- cáncer- transferencia génica.

Abstract:

After the discovery of the human genoma, studies have been focused on the investigation not only of the pathogenesis of diseases, but go further into trying to characterize their molecular basis and genetic abnormalities, with the purpose of treating not only the consequences of the pathologies, but also their cause. It is thus that genetic therapy was originated, being a therapeutic tool where the genetic information of the cells of an individual is manipulated and transferred, either for introducing a new function, re-establishing a cell function which was abolished or defective, or interfere with an already existing function. This therapy was initially conceived for treating diseases with monogenetic alterations, but at present its good results have given rise to investigations in various clinical and immunological fields, in neurological degenerative processes, and in cardiovascular and metabolic diseases; other applications of genetic therapy are based on fighting against multiple neoplastic processes and diseases caused by virus, such as AIDS. In the field of dermatology, it has been considered imperative to search for answers for those pathologies with palliative treatments, or where conventional therapeutic schemes are not effective, since they severely compromise the patient's quality of life, such as in metastatic melanomas and epidermolysis bullosa, among others.

Key words: genetic therapy, genetic diseases, cancer, genetic transfer.

Abreviaturas:

VEGF	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL
C-FOS	PROTEÍNA CODIFICADA EN HUMANOS POR EL GEN FOS
P53	PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES
CIT P450	CITOCROMO P450 ENZIMA CON FUNCIÓN DE MONOXIGENASA

ADA	ENZIMA ADENOSIN DEAMINASA
HGH	HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA
BRAF	PROTEÍNA QUINASA SERINA-TREONINA
EB	EPIDERMÓLISIS AMPOLLAR

producen niveles locales sostenidos de proteína, mientras que los niveles sistémicos de IFN- γ siguen siendo bajos. En estudios fase I / II, En estos ensayos, se observó una mejoría solo en los pacientes CL y los linfomas con células gigantes, que desarrollan el marcador CD30+, mientras que los pacientes con el síndrome de Sezary, no se observaron recuperaciones. Los autores sugieren que los pacientes tratados en las etapas más tempranas de la enfermedad, son los que mejor se benefician de este tipo de tratamiento.^(45,46)

Algunos autores plantean que tanto la expresión del transgen y el vector adenoviral por sí misma contribuyen a la regresión de lesiones de la piel y los perfiles de expresión génica obtenidos de las lesiones cutáneas de pacientes antes y después del tratamiento con TG-1042 han revelado una firma genética distinta con niveles importantes de IFN- γ y numerosos genes inducibles. IFN- γ muy probablemente promueve la inmunogenicidad del tumor y exhiben profundos efectos antitumorales, actuando sobre las células inmunes. Esta terapia de regresión inducida en los pacientes con LCCT y CBCL es una buena estrategia terapéutica, y en el curso de ensayos futuros se esperan que proporcionen nuevos datos acerca de experimentación dirigida piel y mejoras en los mismos.^(39,45,46)

TERAPIA GÉNICA Y PSORIASIS

El rasgo más característico de la psoriasis es la hiperproliferación y diferenciación alterada de la epidermis. Además de demostrar complejas alteraciones inmunológicas, bioquímicas, vasculares y neurológicas, tiene existe una intensa respuesta inmune mediada por células T y una producción elevada de factor de necrosis tumoral (TNF). Es por esta razón que el tratamiento dirigido a esos mediadores inflamatorios, conduce a la remisión casi completa de la enfermedad. Recientes estudios han asociado a diferentes variantes genéticas (Loci) con funciones o expresiones diferentes de elementos claves en la respuesta inmune, tales como los que participan en la defensa, presentación antigénica o con el desarrollo de patología.^(47,48,49) Diferentes autores han identificado genes con arreglos genéticos complejos en piel lesional de psoriasis, encontrándose:

- Genes muy sobrerregulados; incluye SERPINB4, PI3, DEFB4, y varios miembros de la familia S100.
- Genes muy bajo regulados; incluye factor de inhibición 1 Wnt (WIF1), beta celulina (BTC) y CCL27.

Los genes sobrerregulados, fueron de respuesta de defensa y de diferenciación de queratinocitos. Los genes bajo regulados, participan en el metabolismo y regulación de los ácidos grasos.^(50,51,52,53,54)

Un interesante estudio francés realizado entre 1996-2001 en grupos familiares afectados por psoriasis (126 familias) demostró la presencia de un locus de susceptibilidad dentro de la región HLA, específicamente

en el área del cromosoma 6q21 y 20p13. Este marcador, fue el primer gen asociado con susceptibilidad a la psoriasis. El gen ADAM33, es el gen de susceptibilidad más estudiado recientemente. Este gen codifica una proteína metaloproteasa, las cuales también se encuentran asociadas en los procesos de angiogénesis. Este gen se ha asociado también con el asma y la dermatitis atópica, lo que confirma que enfermedades del sistema inmunológico son controladas por genes de susceptibilidad comunes, con efectos generales sobre la inflamación cutánea y la inmunidad.⁽⁵⁵⁾

Se ha sugerido que algunos de los polimorfismos ADAM33 puede afectar la eficiencia de empalme o el volumen de ARNm. Es biológicamente plausible que ADAM33 sea relevante para el desarrollo de la psoriasis, ya que pueden estar implicados en la respuesta inflamatoria o en la interacción célula-célula y célula-matriz que son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de un tejido.⁽⁵³⁾

TERAPIA GÉNICA Y ACNE

Se ha reportado que la deficiencia del factor de transcripción FoxO1, el cual suprime el receptor androgénico y otros receptores claves en la genética de la proliferación celular y biosíntesis de lípidos y citocinas.⁽⁵⁶⁾ La biosíntesis de lípidos y citocinas. Elevados factores de crecimiento durante la pubertad y la persistencia de factores de crecimiento debido a las señales para estimular la exportación de Fox O1 fuera del núcleo al citoplasma, por la activación de la fosfocidil inositol-3 quinasa (PI3K) / Akt vía, hacen que en el sistema se desencadene e inducen la reducción de los FoxO1, llevando a un aumento de andrógenos, mediados por activación del receptor y transducción de señales, aumento de la proliferación celular andrógeno-dependiente, inducción de la lipogénesis sebácea y regulación aumentada de Toll-like receptor-2-dependientes de citocinas inflamatorias.^(56,57,58) Estas percepciones podrían mejorar nuestra comprensión de la acción retinoides en dermatología y podrán establecer nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del acné y otros trastornos hiperproliferativos de la piel.⁽⁵⁷⁾

LIMITACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA

- El producto génico puede expresarse en niveles subterapéuticos, a menudo inferiores al 1% de la cantidad normal. En parte, ello se debe a que tan solo algunas células diana incorporan con éxito al gen normal. Además, la inserción aleatoria del retrovirus en el genoma del huésped puede afectar la regulación del gen. La transcripción cesa a menudo al cabo de algunas semanas o meses.⁽⁵⁹⁾
- Dificultades para alcanzar el tejido diana: por ejemplo, a menudo es difícil alcanzar las neuronas afectadas responsables de enfermedades del sistema nervioso central.⁽⁵⁹⁾

- Potencial de oncogénesis. Puesto que los retrovirus se integran al azar en el DNA del huésped, podría localizarse junto a un protooncogen, activarlo y ocasionar así una formación tumoral. Para minimizar esta posibilidad se alteran los promotores retrovirales; hasta ahora no se han descrito otros casos directamente atribuibles a la inserción de retrovirus.
- Necesidad de una regulación precisa de la actividad del gen. La regulación precisa de la actividad del gen no es necesaria en algunas enfermedades, como ejemplo una expresión 50 veces superior de la adenosina desaminasa, sin embargo, es fundamental para enfermedades como la talasemia, en la que el número de cadenas de alfa globina y beta globina debe ser muy equilibrado. Es difícil alcanzar una precisión utilizando la terapia génica retroviral.
- Los retrovirus solo infectaran las células en división activa. Esta propiedad de los virus impide su utilización en células que no se dividen o de división lenta (ejemplo, las neuronas).^(59,60,61)

Uno de los principales problemas de la técnica que resta por superar, es el del perfeccionamiento de los métodos de distribución de los genes terapéuticos a las células. Habría que determinar también cuánto puede tolerar la célula que se le aumente su cantidad de ADN (el cual se va incrementando cuando se introducen los nuevos genes) para que, a pesar de este aumento, pueda seguir funcionando normalmente. Otro problema que se ha detectado es que muchas veces los genes introducidos funcionan pobremente o se eliminan después de un tiempo. Esto se ha relacionado con la respuesta inmunológica que desencadenan los vectores virales que haría que el sistema inmune eliminara las células que éstos han "infectado" con el gen normal.

Un aspecto importante sobre el cual son muy estrictos los organismos responsables de dar las autorizaciones para los estudios clínicos es el de garantizar la inocuidad de los virus utilizados, tomándo en cuenta que provienen muchas veces de virus patógenos. La búsqueda de mejores metodos para garantizar esta inocuidad es objeto de activa investigación. Otra dificultad que también se ha planteado son los costos de los protocolos clínicos, pues hasta ahora éstos son demasiado elevados para emplearlos como procedimientos de rutina.^(59,60)

CONSIDERACIONES ETICAS Y TERAPIA GÉNICA

1. La TG sólo debería ser aplicada para tratar pacientes con determinadas enfermedades genéticas raras y no como instrumento de un programa social eugenésico que tratara de mejorar el acervo génico humano.
2. La TG sólo se debería intentar cuando no hay otras alternativas terapéuticas o cuando, habiéndolas, suponen un mayor riesgo o una menor acción beneficiosa.
3. La aplicación de la TG a una enfermedad humana debería

requerir la evidencia de que es segura, beneficiosa, técnicamente posible y éticamente aceptable.

4. La TG de células somáticas para el tratamiento de enfermedades graves puede considerarse ética porque puede ser apoyada por los principios fundamentales de autonomía, beneficencia y justicia.
5. El tratamiento de células somáticas por medio de la TG no presenta problemas éticos diferentes a los de cualquier otro tipo de terapia experimental tales como la utilización de nuevos fármacos o de técnicas quirúrgicas novedosas.
6. La intención de la TG es corregir defectos genéticos desde un punto de vista terapéutico.^(60,61)

Conclusiones

1. La expresión del transgén es fundamental para que una estrategia de terapia génica sea eficaz, particularmente en las destinadas a la corrección de alteraciones monogénicas heredadas.
2. En la práctica se considera que el nivel de expresión de los genes transducidos a células somáticas desaparece en un breve periodo de tiempo o se mantiene de forma inconstante; esto podría ser debido a que existen mecanismos celulares que impiden una adecuada expresión de los genes o bien porque los promotores utilizados no son los adecuados y fallan, además vemos que los datos disponibles de experimentos preclínicos con respecto a métodos de estudio de la expresión de los transgenes son escasos y no concluyentes. Otra de las grandes barreras en el desarrollo clínico de la terapia génica es la capacidad de llevar el transgén a la célula diana, sobre todo para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.
3. En la mayoría de los casos, los vectores disponibles tienen la capacidad de transducir tan sólo una pequeña minoría de células cuando se administran intratumoralmente y no son efectivos en llegar a las células tumorales tras la administración sistémica; esta limitación puede ser parcialmente superada por agentes que induzcan un fuerte efecto de vecindad, como la activación de profármacos o la inmunoterapia génica.
4. En la actualidad se sigue realizando un enorme trabajo para mejorar la capacidad de los vectores y de esta manera transducir células de forma segura y específica para aumentar la capacidad de regulación de la expresión del transgén por los promotores y así mejorar el conocimiento de las condiciones más adecuadas para la transferencia génica.
5. Los resultados de la terapia génica deben tener beneficios que pesen más que los riesgos y deben ofrecer ventajas sobre los tratamientos convencionales, sólo así podrá ser aceptada en la práctica médica general.

Referencias Bibliográficas

- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270: 475-80.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415-19.
- Berns A. Good News for Gene Therapy. *N Engl J Med* 2004;350:1679-80.
- Noguchi P. Risks and benefits of gene therapy. *N Engl J Med* 2003;348:193-94.
- Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2010; 363: 355-64.
- Jiang K, Connolly D, Blumenberg M. Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1991;97:969-73.
- Garlick J, Morgan J. Retrovirus-mediated transduction of cultured epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1991;97:824-29.
- Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6: 331-44.
- Alberts B, Johnson D, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the cell* 4th Edition. Garland Science. New York, Garland Science;2002.
- Dole, J. W., y Shantz, M. From genes to genomes. Concepts and applications of DNA technology. John Wiley & Sons, Ltd,2002
- Gene Therapy for Cancer: Questions and Answers . Available at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/gene> Reviewed: 08/31/2006
- Human genome project information. Available at: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml#status Last modified: Friday, September 17, 2010
- The Journal of Gene Medicine: Gene therapy clinical trials worldwide. Available at: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- Foix Gómez A. Terapia Génica. Disponible en: www.bq.ub.es/cursos/.../terapiagenicaagomezfoix-2009.pdf
- Mas Sánchez E, Ciriza Astrain J, Lacasa Benito I, Milana-Mena J. Terapia Génica. Universidad de Zaragoza, España. Disponible en: <http://aragoneria.com/boreas/articulos/terapiagenica1.htm>
- Oliva JJ. Terapia Génica. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/tergen-2.htm>
- Novelli G, Gruenert DC. Genome medicine: gene therapy for the millennium. *Pharmacogenomics* 2002;3:15-8.
- Shi FS, Weber S, Gan J, Rakhmievich A, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Therapy* 1999;6:81-8.
- Prieto J, Qian C, Sangro B, et al. Biologic therapy of liver tumors. *Surg Clin North Am* 2004;84:673-96.
- Xu GW, Sun ZT, Forrester K, et al. Tissue-specific growth suppression and chemosensitivity promotion in human hepatocellular carcinoma cells by retroviral-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Hepatology* 1996;24:1264-8
- Herraiz M, Beraza N, Solano A, et al. Liver failure caused by herpes simplex virus thymidine kinase plus ganciclovir therapy is associated with mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion. *Hum Gene Ther* 2003;14:463-72.
- Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003;3:13-26.
- Herraiz M, Beraza N, Solano A, Sangro B, et al. Liver failure caused by herpes simplex virus thymidine kinase plus ganciclovir therapy is associated with mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion. *Hum Gene Ther* 2003;4:10-15.
- Qian C, Bilbao R, Bruna O, Prieto J. Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology* 1995;22:118-23.
- Mazzolini G, Qian C, Xie X, Sun Y, et al. Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Therapy* 1999;6:514-22.
- Barajas M, Mazzolini G, Genove G, Bilbao R, et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001;33:52-61.
- Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:1389-97.
- Melero I, Duarte M, Ruiz J, et al. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Therapy* 1999;6:1779-84.
- Sin autor. http://www.bioplanet.net/magazine/bio_1999_novdic_genetica.htm.
- Smalley K, Sondak V. Melanoma An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy *N Engl J Med* 2010;363(9):876-878.
- Flaherty K, Puzanov I, Kim K, et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma *N Engl J Med* 2010; 363:809-819.
- Miller A, Martin C, Mihm J. Mechanisms of disease Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:51-65
- Morgan R, Dudley M, Wunderlich J, Hughes M, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes *Science*. 2006 October 6; 314(5796): 126-129.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC. Adoptive cell transfer therapy following nonmyeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2346-57.
- Ishii N, Hamada T, Dainichi T, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: what's new?. *J Dermatol* 2010; 37:220-30.
- Programa de Investigación DEBRA Internacional en Epidermolisis Bulosa. www.debra-international.org/.../Research_Update_2009_Espagnol.pdf
- Guía de Atención clínica integral de la epidermolísis bullosa hereditaria. Madrid, España. www.msps.es/profesionales/prestacionesSanitarias/epidermolisisBullosa.pdf
- Arpad F, Lajos K, Lars E. French New and Experimental Skin-Directed Therapies for Cutaneous Lymphomas *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:322-34.
- Weinstock MA, Gardstein B. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. *Am J Public Health* 1999;89:1240-44.
- Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997;90:354-71.
- Burg G, Kempf W, Cozzio A, et al. Cutaneous malignant lymphomas: update 2006. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006;4:914-33.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836-48.
- Kaplan EH, Rosen ST, Norris DB, Roenigk HH Jr, et al. Phase II study of recombinant human interferon gamma for treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1990;82: 208-12.
- Jimbow K, Yamana K, Ishida O, et al. Evaluation of rIFN-gamma in the treatment of lymphoma and melanoma of the skin by systemic and intralesional administration (in Japanese). *Gan To Kagaku Ryoho* 1987;14: 152-58.
- Dummer R, Hassel JC, Fellenberg F, et al. Adenovirus-mediated intralesional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas. *Blood* 2004;104:1631-38.
- Gudjonsson JE, Ding J, Johnston A. Assessment of the Psoriatic Transcriptome in a Large Sample: Additional Regulated Genes and Comparisons with In Vitro Models. *J Invest Dermatol* 2010;130:1829-40.
- Nevitt GJ, Hutchinson PE. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 1996;135:533-37.
- Bowcock AM, Shannon W, Du F. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet* 2001;10:1793-805.
- Nomura I, Gao B, Boguniewicz M. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1195-202.
- Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J* 2001;1:272-87.
- Zhou X, Krueger JG, Kao MC. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics* 2003;13:69-78.
- Haider AS, Lowes MA, Suarez-Farinas M. Cellular genomic maps help dissect pathology in human skin disease. *J Invest Dermatol* 2008;128:606-15.
- Haider AS, Peters SB, Kaporis H. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol* 2006;126:869-81.
- Lesueur F, Oudot T, Heath S, et al. ADAM33, a New Candidate for Psoriasis Susceptibility. *PLOS ONE* 2007;9:906.
- Melnik BC. FoxO1 - the key for the pathogenesis and therapy of acne? *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010;8:105-14.
- Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007;120: 2479-87.
- Van der Heide LP, Hoekman MF, Smid MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004; 380: 297-309.
- Ward A, Enrique D, Villaseca G. La terapia génica y sus aplicaciones. *Rev méd Chile* 1998;126:838-45.
- Lonso-Bedate C. Terapia génica. En: C.M. Romeo Casabona, editor. *Genética Humana*, Universidad de Deusto, Fundación BBV, Diputación Foral de Bizkaia, Bilbao 1995:227-267.
- Wivel NA, Walters L. Germ-line gene modification and disease prevention: Some medical and ethical perspectives. *Science* 1993; 262:533-38.

EBS	EPIDERMOLÍTICA O SIMPLE
EBJ	EB DE LA UNIÓN O JUNTURALES
EBD	DERMOLÍTICA O DISTRÓFICA
PSORS1	SUCEPTIBILIDAD PSORIASIS 1
ADAM33	GEN AFECTADO SUCEPTIBILIDAD PSORIASIS

Introducción

El hombre en su afán por aliviar las enfermedades y patologías que aquejan la humanidad, busca diversas formas de combatir las mismas. Es así como surge la terapia génica, como un método de acercamiento al tratamiento de las enfermedades humanas basado en la transferencia de material genético a las células de un individuo, con la finalidad de restablecer una función celular que estaba abolida o defectuosa, para introducir una nueva función o bien interferir con una función existente.⁽¹⁾ 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 claves, a saber: el material genético a transferir, el método de transferencia y el tipo celular que incorporará dicho material genético.^(1,2,3)

Inicios de terapia génica

Desde el descubrimiento de las enzimas de restricción en el año 1970 por Arber y Hamilton se sentaron las bases para transferir genes entre diferentes células u organismos, inclusive pertenecientes a diferentes especies. En 1978 se realizó la primera hormona recombinante insertando el gen de la insulina en *E. coli*, de allí en adelante se afianzaron los conocimientos necesarios para transferir genes a células humanas con el fin de alterar el fenotipo patológico y generar una nueva forma terapéutica.^(2,3)

Para la década de los 90 y tras descifrar el genoma humano, se obtienen aportes importantes en muchas enfermedades. Uno de los logros fundamentales ha sido la identificación de las numerosas mutaciones que causan las enfermedades hereditarias, haciendo posible un preciso diagnóstico de las mismas. El proyecto genoma está dando lugar a un mayor entendimiento tanto de los defectos causados por un solo gen, como de las enfermedades multifactoriales, tales como cáncer y diabetes.^(3,4)

Dentro de la estructura del ADN, se encuentran las aberraciones, alteraciones, mutaciones o translocaciones de bases moleculares que conllevan a la síntesis de un proteína defectuosa, ausencia de enzimas o alteraciones cromosómicas, es allí donde puede intervenir la terapia génica, detectando la anomalía y realizándose correcciones

al reincorporar el gen terapéutico para ejercer su función de manera adecuada.^(4,5) Fue utilizada por primera vez con intención terapéutica en un paciente que padecía una inmunodeficiencia severa por un déficit de adenosin deaminasa (ADA). El error genético de sus linfocitos se corrigió *ex vivo* por transferencia génica y estos linfocitos ya corregidos se re-infundieron.^(5,6) 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.^(1,2)

Inicios de ensayos clínicos en piel:

Existen características particulares que hacen de la epidermis un sistema idóneo en terapia génica: es el más accesible de todos los tejidos somáticos lo que facilita tanto su manipulación como la observación del resultado; se conoce bien la biología molecular y celular de los queratinocitos y pueden cultivarse "*in vitro*". Hay experiencia hospitalaria en el trasplante de piel humana, siendo ésta operación relativamente poco gravosa para el paciente. Se pueden cultivar las células madre en las cuales una alteración genética. Un ejemplo de este tipo de trasplante, podría ser con células madres cultivadas y modificadas genéticamente, por la introducción de un gen exógeno que tiene la función que se desea cambiar. Los queratinocitos genéticamente alterados son capaces de secretar el producto del gen exógeno en el torrente sanguíneo, además, los trasplantes son fácilmente removibles en caso de complicaciones.^(7,8,9)

Existen muchos ejemplos de potenciales aplicaciones de terapia génica a través de queratinocitos epidérmicos, tal como enfermedades hereditarias de la piel. Los queratinocitos portan versiones corregidas de los genes cuyas mutaciones dan lugar a la enfermedad, tal como: ictiosis lamelar (déficit en el gen de la transglutaminasa-1), epidermólisis ampollar, bien intraepidérmica, distrófica o de unión (déficit de los genes de citoqueratinas, colágenos, laminina, componentes hemidesmosómicos), xeroderma pigmentoso (déficit de los genes de reparación del ADN).⁽⁷⁾

Los primeros ensayos de terapia génica en la piel fueron realizados en 1987 cuando se transfirieron queratinocitos en cultivo, "*ex vivo*", con un retrovirus portador del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH) e incapaz de replicarse en la célula diana. La determinación de hGH en el medio de cultivo de los queratinocitos modificados, demostró que la hormona se sintetizaba y se secretaba activamente. Al trasplantar láminas de queratinocitos productores de hGH en ratones inmunodeficientes no se detectó hGH en sangre, pero quedó demostrado que las células epidérmicas pueden secretar proteínas como las glándulas endocrinas. Actualmente se ha conseguido mantener la expresión de distintos genes durante al menos 40 semanas. Estos resultados, aunque todavía en fase de experimentación en modelos animales, abre las puertas

para una nueva alternativa terapéutica de reposición de proteínas ausentes o no funcionales debido a alteraciones en sus genes correspondientes. Así, un “parche” de queratinocitos productores-exportadores de cantidades adecuadas de una proteína, por ejemplo el factor IX en hemofílicos, reemplazaría a los engorrosos tratamientos. ^(7,8,9,10)

Patología Molecular:

La patología molecular puede expresarse por deficiencia parcial o total de una proteína anómala con pérdida o alteración de su función o exceso de proteína normal, todo esto conlleva a enfermedad. ^(10,11,12,13) Figura 1.

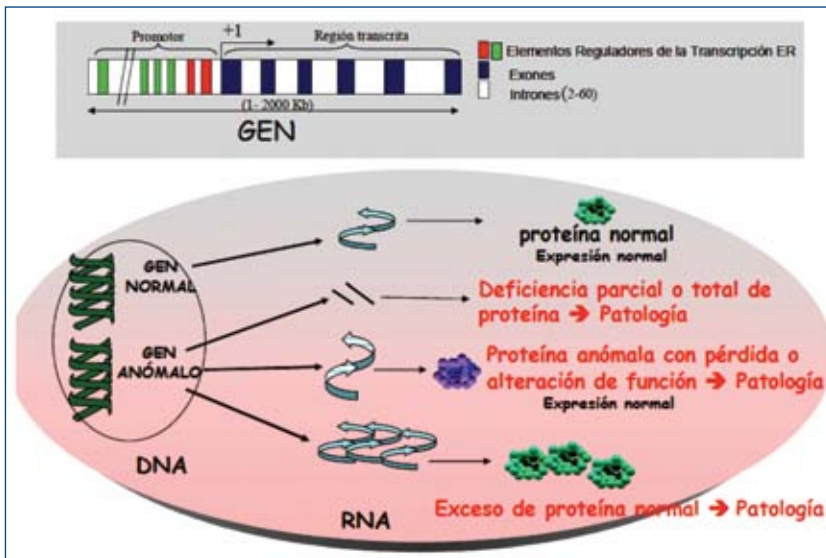


Figura 1. Representa esquemáticamente como gen anómalo, puede expresar las diferentes patologías en las síntesis de una proteína.

Tomado de www.bq.ub.es/cursos/.../terapiagenicaagomezfoix-2009.pdf

Terapia génica:

“ Es una técnica terapéutica 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”. (Wolf y Lederberg, 1994). ^(2,13,14,15)

Concretamente el término terapia génica unifica los principios de la farmacología con los de la genética, pues implica tácitamente la utilización de ácidos nucleicos como agentes farmacológicos para el tratamiento de estados patológicos; con ello se persigue modificar el genoma de las células somáticas, transfiriendo copias normales de genes para que produzcan cantidades adecuadas de material genético normal, cuya acción corregiría la enfermedad genética. ^(11,12)

Todo organismo, aún el más simple, contiene una enorme cantidad de información almacenada en el ADN, que a su vez está dividido en una gran cantidad de genes (la cantidad varía de acuerdo a la especie). Los genes controlan todos los aspectos de la vida, incluyendo el metabolismo, la forma, el desarrollo y la reproducción. Por ejemplo, la síntesis de una proteína X hará que el individuo manifieste el rasgo para “pelo negro”, mientras que

una proteína Y determinará el “pelo castaño”.⁽¹²⁾

¿COMO SE REALIZA LA TERAPIA GÉNICA? A través de dos categorías diferentes:

- 1.-Terapia células germinales: el cambio genético efectuado es heredable al afectar células reproductivas, se realiza en células germinales como el ovulo, espermatozoide, el cigoto o primeras divisiones celulares. Este mecanismo inspiró la película *my sister keeper*. ^(13,14)
- 2.-Terapia células somáticas: se realizan cambios genéticos no heredables, en cualquier célula somática (no germinal) del cuerpo. ^(13,14)

Puede ser realizada por:

- * Bloqueantes de genes: cuando la afección génica se produce por la ganancia de función o por mutaciones negativas dominantes. Aplicaciones: herencias dominantes.
- * Sustitución de genes: Si el defecto en un gen produce una función de su producto inadecuada o aberrante, entonces la sustitución de este con una copia funcional debe curar o revertir el problema. Aplicaciones: enfermedades recesivas.

Normas y requisitos para recibir terapia génica:

- El gen debe estar aislado y debe estar disponible para la transferencia clonación.
- Debe haber un medio efectivo para la transferencia del gen.
- Por el momento, muchos ensayos utilizan vectores retrovíricos, adenovíricos o técnicas físicas y químicas.
- El tejido diana debe ser accesible para la transferencia genética.
- No debe haber ninguna forma de terapia efectiva disponibles.
- La terapia génica no debe dañar al paciente. ^(13,14)

Células Diana: ésta debe ser:

accesible, de larga duración y proliferable. Ejemplos: fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, linfocitos. Existen dos vías para suministrar los genes a las células dianas:

- Terapia Génica ex vivo:** en la cual se extraen células al paciente para la introducción de los genes terapéuticos, pudiendo utilizar para ello vectores virales o no virales y el posterior trasplante autólogo de las células corregidas genéticamente. Es la más utilizada.
- Terapia Génica in vivo:** Se refiere al suministro directo del gen terapéutico a las células somáticas diana (ej. Infusión intravenosa, inyección estereotáctica) sin la necesidad de extraer y cultivar las células para la inserción génica.^(13,14) (Figura 2).

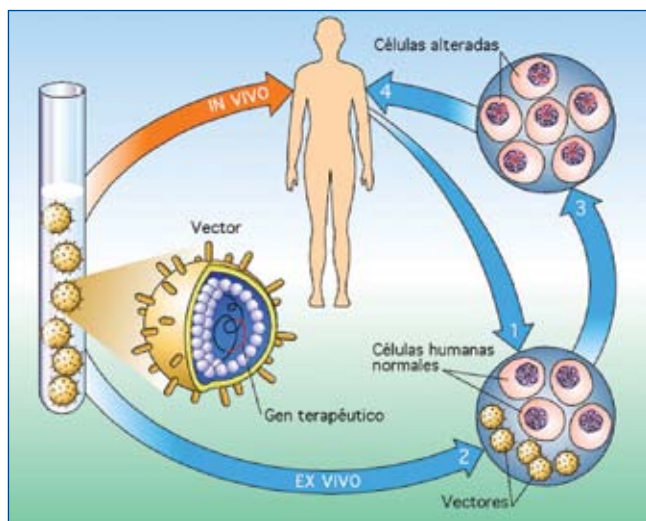


Figura 2. Esquema terapia génica, ex vivo, in vivo. Tomado de miltonpinedo.blogspot.com/2009_06_01_archive.html. Resume de los pasos necesarios para realizar la terapia génica: 1: aislamiento del gen que interesa. 2: Secuencia del gen. 3: Clonaje del gen. 4: Persistencia y/o amplificación del gen dado en las células escogidas. 5: Trasplante e implantación y/o inyección de las células con el gen clonado. 6: Persistencia y/o multiplicación de las células en el ser vivo. 7: Liberación de la proteína deficitaria y corrección del defecto genético.

Introducción del Transgen

- También denominado construcción genética. La Transfección: es un proceso mediante el cual una molécula de interés es introducida en células eucariotas mediante métodos físicos, químicos o mecánicos o a través de vectores.^(15,16) (Figura 3)

Terapia génica en células somáticas bloqueando genes:

Terapia con ribozimas:

Los ribozimas son ARN con actividad enzimática. Catalizan sustratos de ARN llevando a cabo la rotura y

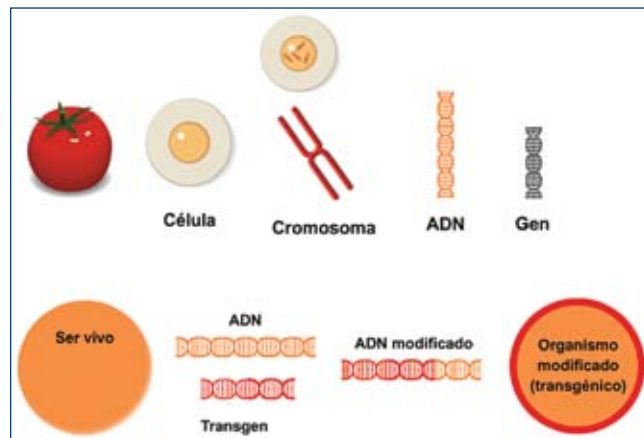


Figura 3. Formación de un transgen. Tomado de <http://www.iesmariazabrano.org/Departamentos/flash-educativos/transgenicos.swf>

ligación de las cadenas en sitios específicos. Diferentes centros catalíticos de ribozima han sido incorporados en ARNs antisentido, de tal forma que le dan la capacidad de aparearse con un ARN diana, que son sustratos para dichos centros cortándolos en sitios específicos. La actividad del centro catalítico del ribozima da el corte y destrucción del ARN diana. Aparejando el ribozima con el sustrato necesitaría poco tiempo para cortar el ADN diana, inactivándolo funcionalmente. Una vez que la diana ha sido cortada, el ribozima puede disociarse de los productos cortados y repetir el ciclo de unión, rotura y disociación. La habilidad de los ribozimas para cortar dianas y después reciclarlas proporciona una ventaja sobre los ARN antisentido estándar; así actúa este químicamente y no destruye la función del ARN diana.^(13,14,15) Se esquematiza en la siguiente figura. (Figura 4)

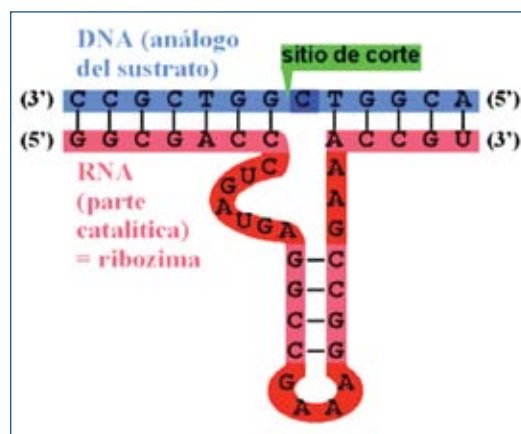


Figura 4. Sitio de corte. Terapia ribozimas. Tomado de <http://biomodel.uah.es/model1/rna/ribozim.htm>

Los ribozimas pueden ser producidos química, bioquímicamente o biológicamente, y algunas características de los oligodesoxinucleótidos antisentido tales como modificaciones químicas en la cadena o, en las uniones entre nucleótidos, pueden ser incorporadas dentro de la molécula del ribozima sintético, añadiendo así estabilidad a la molécula. La especificidad de apareamiento de bases, puede ser usada para dirigir los ribozimas a sus dianas. Así se puede bloquear la síntesis de la proteína a nivel de la transcripción, traducción, o causando destrucción de ARNm. ^(15,16)

Terapia Antisentido:

El término antisentido se aplica a secuencias cortas de ADN o de ARN (oligonucleótidos) diseñadas para ser complementarias de secuencias génicas específicas, con el fin de interferir el flujo de información genética. ^(13,14,15) Este oligonucleótido puede adherirse por hibridación al ADN de doble hebra localizado en el núcleo, creando secuencias en triple hélice que bloquean la transcripción del gen correspondiente; puede unirse con el ARNm a través de puentes de hidrógeno por complementariedad de las bases correspondientes creando un ARN de doble hélice no funcional o puede unirse a la proteína ya formada bloqueando su actividad. ^(16,17) (Figura 5).

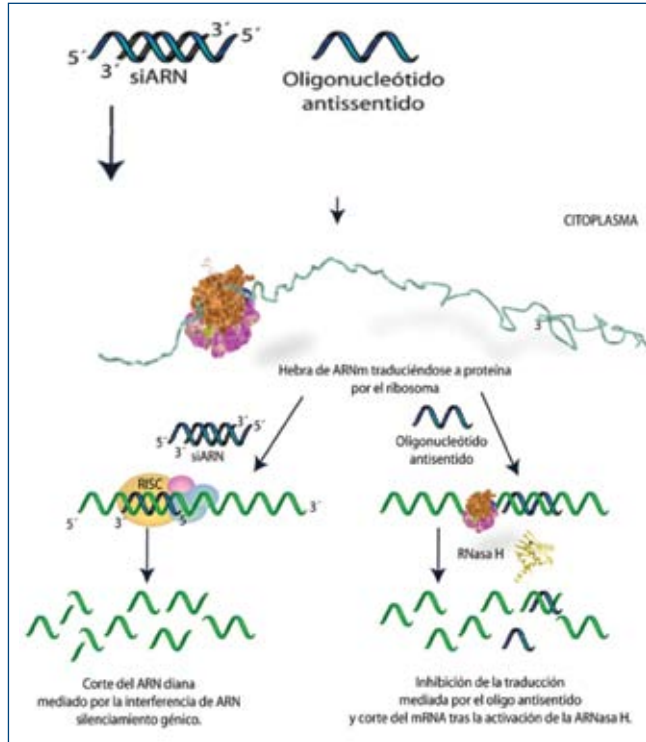


Figura 5. Terapia antisentido. Transfección en las células de pequeños ARN interferentes siARN o de oligonucleótidos antisentido y su mecanismo de actuación. Tomado de flagellum.files.wordpress.com/2009/06/fármaco.

Esta estrategia ha sido la base para el desarrollo de dos fármacos ya aprobados por la FDA, a saber: *Vitravene* (ISIS) que inhibe la replicación del citomegalovirus CMV, causante de retinitis en SIDA y causante de ceguera; aprobado en 1998, se administra por inyección intravítrea. El otro producto es *Macugen*[®] (pegabtanib), un oligonucleótido aptámero diseñado para tratar la degeneración macular. Es un oligonucleótido pegilado (unido químicamente al polietilenglicol) que se une e inhibe el VEGF (vascular endothelium growth factor), tiene efectos angiogénicos y antiinflamatorios que contribuyen a la patología. Se administra por inyección intravítrea. Fue desarrollado por Eyetech Pharmaceuticals, Inc, y Pfizer lo comercializa desde diciembre 2004.

Terapia génica en células somáticas con sustitución de genes: se realiza a través de medios físicos químicos y mecánicos:

- **Coprecipitación con fosfato de calcio:** el fosfato cálcico es un producto químico que perturba la membrana celular permitiendo que el ADN cargado negativamente supere la repulsión natural de la membrana celular cargada negativamente. Se realiza en cultivos celulares por lo cual la técnica es ex vivo. No es una técnica que provoque toxicidad en las células, pero la expresión del transgén por este metodo es muy pequeña. ^(15,16)
- **Microinyección:** consiste en inyectar el ADN en células independientes directamente en el núcleo, evitando la degradación citoplásmica y lisosomal. Se realiza mediante un micromanipulador y las células que sobreviven presentan una alta eficacia de expresión. Esta técnica tiene la desventaja de que es muy laboriosa y de que no todas las células resisten esta manipulación. Se realiza con microscopio invertido que permite la visualización. Este sistema se suele utilizar "ex vivo". ^(15,16,17)
- **Electroporación:** consiste en el sometimiento de células a pulsos eléctricos cortos de alto voltaje, los cuales producen la apertura temporal de poros en la membrana celular a través de los cuales el ADN exógeno puede pasar. Tiene la desventaja de que algunas células no resisten el shock eléctrico. ^(15,16,17)
- **Biobalística o proyectil:** Consiste en el bombardeo de los tejidos con partículas de oro tungsteno que llevan adheridas a ellas el ADN. El bombardeo se realiza mediante una descarga con helio como si fuera una pistola, de allí el nombre de la técnica. La capacidad de penetración es limitada usándose en líneas celulares específicas como epidermis, músculo e hígado. Su expresión es transitoria y en la zona de descarga se produce una muerte celular. Esta técnica puede realizarse "ex vivo" (en el caso de células animales) e "in vivo" (en el caso de células vegetales). ^(15,16,17)

Terapia génica en células somáticas, con sustitución de genes a través de vectores no virales:

Se recurre a algún vector que facilite el proceso de transferencia del gen y permita la entrada y localización intracelular del mismo para que sea funcionante. La gran diversidad de situaciones en las que podría aplicarse la terapia génica hace imposible la existencia de un solo tipo de vector. Sin embargo, pueden definirse las características para un "vector ideal" las siguientes situaciones concretas:

- Reproducible.
- Estable.
- Que permita la inserción de material genético sin límite de tamaño.
- Que permita la transducción tanto en células en división como quiescente.
- Que permita la integración específica del gen.
- Que actúe sobre células específicas.
- Que la expresión del gen terapéutico pueda ser regulada.
- Que carezca de elementos que induzcan una respuesta inmune.
- Que pueda ser caracterizado completamente.
- Inocuo. Que minimice sus posibles efectos secundarios.
- Fácil de producir y almacenar.
- Costos razonables. ^(15,16,17,18,19)

Sistemas no virales:

a) Liposomas: Son vesículas compuestas de una bicapa lipídica que rodea a un volumen acuoso. Son capaces de hacer entrar DNA en la célula. ^(13,14,15) Han sido utilizados desde 1960 con el objetivo de suministrar drogas "in vivo"; su seguridad en humanos está avalada por muchos ensayos clínicos. Sus ventajas son la ausencia de límites en el tamaño del ADN que puede admitir y ser transferido y su incapacidad para recombinarse o integrarse en el genoma celular así como no inducir respuesta inmune. Existen dos tipos: catiónicos y aniónicos. Los primeros se encuentran cargados positivamente por lo que interactúan con la carga negativa del ADN. Las ventajas de los liposomas es que protegen de la degradación al transgén hasta su llegada al núcleo. Como desventaja presentan la baja eficacia de transfección, una expresión transitoria, cierto

grado de toxicidad celular y pueden ser inhibidos por componentes séricos. ⁽¹⁶⁾

- b) Plásmidos y vectores conjugados: La manera más simple de realizar terapia génica es la inyección de ADN en un vector de expresión en la circulación y dejar que este alcance el sitio específico de la patología y se exprese establemente, es conocido como ADN desnudo. Consiste en la introducción del ADN en una solución salina o sérica, normalmente mediante inyección intramuscular, para conseguir la expresión del transgén. Se ha observado actualmente expresión en timo, piel, músculo cardíaco y músculo esquelético. No se conoce el mecanismo por el que llega a entrar a la célula aunque se postula que es a través del complejo del poro nuclear. ^(15,16)
- c) Cromosoma artificial: son vectores de transferencia de genes que se comportan y se construyen como los cromosomas humanos normales. Se replican, segregan de manera estable y usan los componentes funcionales de la célula humana, evitando así los problemas de integración en el genoma del huésped, por tanto, pueden introducirse en otras células humanas sin problema. Resultan muy útiles para estudiar la expresión y entender la función de los cromosomas, ya que ofrecen la posibilidad de expresar grandes fragmentos de ADN humano en otros modelos animales, aun en fase experimental. ^(16,18) Figura 6.

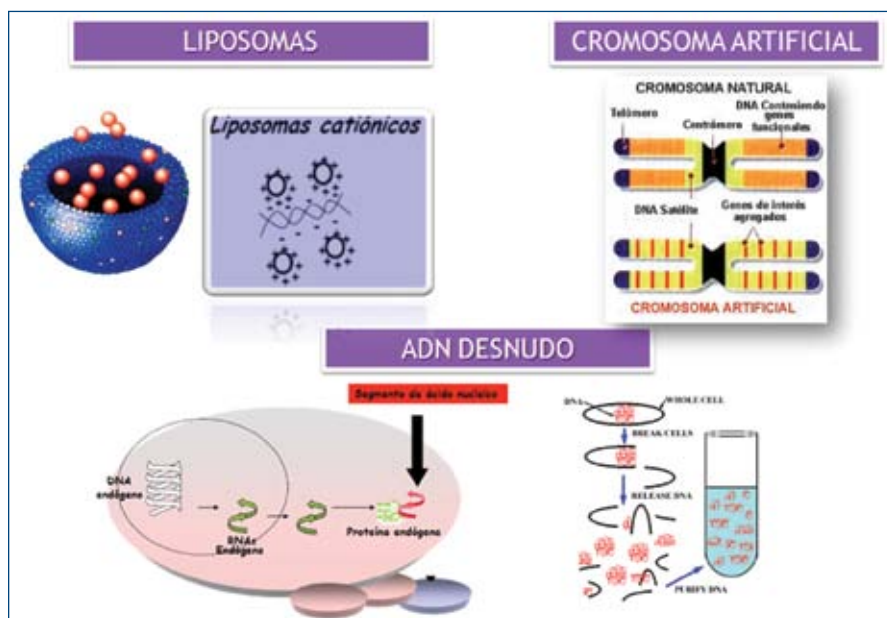


Figura 6. Vectores no virales.

Tomado de <http://www.aragonesasi.com/boreas/articulos/terapiagenica1.htm>

Los sistemas virales:

Es uno de los vectores más utilizados, puesto que conlleva a un mayor éxito de transfección. En todos los casos lo que se busca es eliminar el mayor número de genes y secuencias del virus para que pueda captar el DNA exógeno. Los vectores virales pueden ser utilizados tanto "in vivo" como "ex vivo". Existen cuatro tipos de virus que están siendo utilizados actualmente en ensayos clínicos, ellos son: retrovirus, adenovirus, los virus adenoasociados y el virus herpes simple.^(20,21,22)

TERAPIA GÉNICA Y ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Más del 65% de los protocolos de terapia génica humana han sido aprobados en el campo oncológico.^(18,19,20) Tras un gran estudio de todos estos procesos se admite que el cáncer no es consecuencia de un solo evento sino el resultado de una cadena de alteraciones genéticas que varían de acuerdo con el tipo y estado del cáncer. Probablemente lo más difícil de llevar a cabo, es dar con las alteraciones genéticas claves de las células malignas y corregirlas,⁽²⁰⁾ un ejemplo es el gen supresor tumoral p53, que está inactivado en muchos tumores y como consecuencia de esto se activa el crecimiento tumoral y aumenta la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. Teóricamente, si se transfiere la forma no mutada del gen p53 a las células tumorales que lo tienen inactivado se debería inhibir su crecimiento y aumentar su sensibilidad a los quimioterápicos. Lo que se ha visto en modelos animales de tumores es que la administración repetida (por vía intraarterial o intratumoral) de un vector adenoviral que exprese el gen p53 inhibe el crecimiento tumoral.⁽²¹⁾

En los ensayos clínicos en los que se ha empleado la inyección intratumoral de un vector como éste, la acción es segura y es capaz de producir remisiones tumorales objetivas,⁽²²⁾ en otros tumores, parece que este tratamiento puede potenciar la acción de la quimioterapia y la radioterapia. En base a estos datos este producto ha sido autorizado en China, lo que hace de él, el primer agente de terapia génica comercializado en el mundo. La eficacia de muchos citostáticos depende del equilibrio entre su actividad antitumoral y sus efectos adversos. Transfiriendo al interior del tumor genes que producen enzimas que transforman profármacos en sus metabolitos tóxicos, se consigue poder administrar dosis altas de citostáticos a nivel tumoral con bajos efectos sistémicos. El gen activador de profármacos mejor conocido es el de la timidin kinasa del virus herpes simple,⁽²³⁾ ésta enzima transforma el ganciclovir en una compuesto fosforilado que es tóxico para las células tumorales por inhibir la síntesis del ADN tanto nuclear como mitocondrial.⁽²⁴⁾ En modelos animales se ha observado que la transferencia de este gen a tumores seguida de la administración sistémica de ganciclovir produce remisiones tumorales.⁽²⁵⁾ En humanos, el tratamiento se ha mostrado seguro y en ciertos tumores como los que se desarrollan en la próstata, se está

investigando su utilidad.

Desde el punto de vista clínico, la mayor barrera para este tipo de estrategia es la obtención de una transducción tumoral significativa con la administración sistémica de los vectores, por lo que solo cabe aplicarlo en tumores localizados que no se puedan tratar por otros medios. En la inmunoterapia génica se transfieren a células tumorales o a células relevantes del sistema inmune, genes que producen moléculas capaces de estimular la respuesta inmune frente a las células malignas, no importando en que lugar del organismo se encuentren. Una amplia variedad de genes que codifican para citocinas activadoras del sistema inmune, han resultado ser muy activos en modelos animales de muy distintas neoplasias. La transferencia intratumoral de estos genes se traduce en concentraciones de citocinas muy elevadas a nivel tumoral y despreciables a nivel sistémico. Como ejemplo, se ha visto en modelos animales que la transferencia del gen de la interleucina-12 a tumores hepáticos o al tejido hepático circundante ejerce una actividad antitumoral significativa, por su capacidad para activar linfocitos T citotóxicos y células natural killer, e inhibir la angiogénesis tumoral.^(26,27)

En humanos, este tratamiento es seguro y capaz de inducir la regresión tumoral, aunque su eficacia es bastante modesta porque la producción de interleucina-12 es intensa pero breve.⁽²⁸⁾ Las células dendríticas tienen la propiedad de iniciar y modular una respuesta inmune eficaz antitumoral después de una migración selectiva a los ganglios linfáticos y al bazo. Para aumentar su capacidad de presentación de antígenos, las células dendríticas pueden ser genéticamente modificadas "ex vivo" para expresar antígenos tumorales como es la alfa-fetoproteína.⁽²⁹⁾ Algunas de estas estrategias están en fase de ensayo clínico y pronto habrá datos disponibles en humanos.

Enfermedades Monogénicas

La aplicación más sencilla que se propuso inicialmente para la terapia génica fue la intervención de enfermedades monogénicas. En los pacientes con estas enfermedades, es un solo gen el que está alterado de manera que no realiza correctamente su función, se dice entonces que el gen está mutado. Mediante terapia génica, una nueva copia del gen en su "versión" correcta podría ser introducida en el individuo afectado para sustituir el gen alterado y realizar así las funciones cuya falta originan la enfermedad. Aunque de forma individual se consideran rarezas, en conjunto constituyen una parte considerable de las enfermedades crónicas. Este grupo de enfermedades comprende trastornos de muy diversa índole, en los que un gen defectuoso determina que no se sintetice una proteína específica (como en la hemofilia o en la hipercolesterolemia familiar), o bien que se elabore una proteína anormal (como en el déficit de alfa-1-antitripsina). En ambas situaciones, la ausencia de la proteína correcta puede ocasionar muy

diversas manifestaciones, según la función estructural o enzimática que ejerza dicha proteína o la interferencia que la proteína anormal produzca en el funcionamiento tisular. En general se trata de enfermedades en las que la farmacoterapia convencional resulta poco eficaz, por lo que se buscan otras alternativas como la terapia génica.⁽³⁰⁾

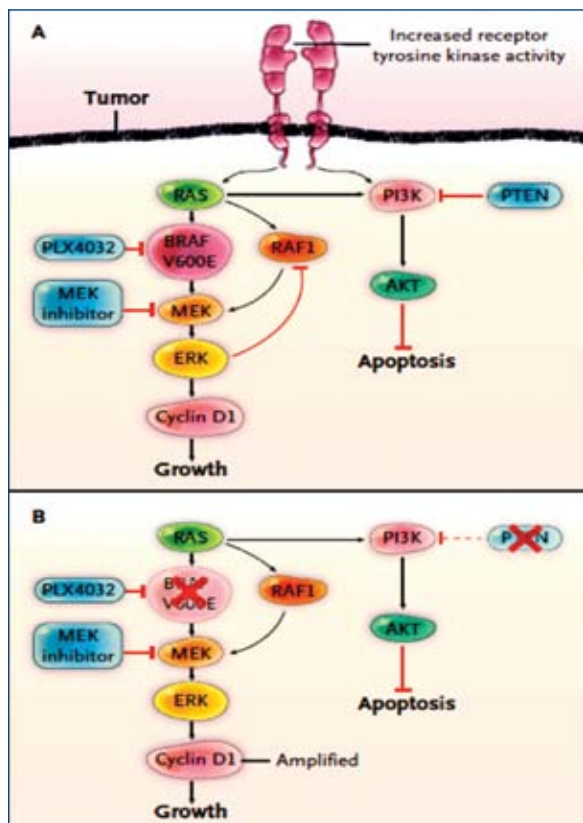
TERAPIA GÉNICA Y MELANOMA

Actualmente no existe una terapia prometedora estándar disponible para el tratamiento de los melanomas en estadios avanzados. Mutaciones en los componentes de las proteínas quinasas (MAPK) protein kinasa, se encuentran presentes en un 40 % de los melanomas y hasta en un 78 % en otras neoplasias: Se conoce que mutaciones somáticas en el gen que codifica para la proteína quinasa serina-treonina (BRAF) en la mayoría de los melanomas, ofrece la oportunidad de pruebas de terapias con oncogenes dirigida para esta enfermedad (Figura 7).^(31,32,33,34) La mutación BRAF se ha encontrado también en carcinoma papilar de tiroides.⁽³⁴⁾

Otra medida terapéutica para mediar la regresión del tumor es por transferencia genética adoptiva de linfocitos. El objetivo específico es conferir reconocimiento por los linfocitos tumorales autólogos de sangre periférica mediante el uso de un retrovirus que codifica un receptor de células T. En un estudio realizado en 15 pacientes con diagnóstico de melanoma avanzado, la transferencia adoptiva de estas células transducidas resultó en inserción duradera con niveles superiores a 10% de linfocitos en sangre periférica por lo menos 2 meses después de la infusión. Se observó también la persistencia de estas células (dos pacientes), hasta un año después de haber suministrado la infusión, demostrando la regresión de las metástasis inducidas por estos melanomas.⁽³⁵⁾ Este estudio sugiere el potencial terapéutico de las células genéticamente modificadas para la terapia biológica del cáncer.

TERAPIA GÉNICA Y EPIDERMOLISIS AMPOLLAR

La epidermólisis ampollar o bulosa (EB) se refiere a un grupo de enfermedades hereditarias con presentación



A: Muestra dos vías de señalización importante para el crecimiento y la progresión del melanoma. Proteínas activadas por mitógenos constitutiva (MAP) señalización en la vía RAS-RAF-MEK-ERK conduce el crecimiento de las células de melanoma a través de la sobre regulación de cyclin D1.

El tratamiento con PLX4032 puede resultar en la regresión de los melanomas portadoras de la BRAF mutación V600E porque la droga bloquea la actividad de el mutante BRAF. La supervivencia de las células del melanoma y de la resistencia a la apoptosis mediada a menudo a través de la constituyente actividad de fosfoinosítidos-3-quinasa (PI3K) y la serina-treonina proteína quinasa AKT, que surge a través de múltiples mecanismos, incluyendo la pérdida de expresión de los supresores tumorales y de la fosfatasa tensina homólogo (PTEN).

B: Ilustra el potencial mecanismos por los cuales V600E BRAF mutado melanomas pueden mostrar resistencia intrínseca o adquirida a BRAF inhibición. El aumento de la señalización a través RAF1, posiblemente debido al aumento de RAF1 expresión o el aumento de los receptores actividad tirosina cinasa, restablece la actividad de MEK y ERK y da lugar a la expresión de ciclina D1. Además, algunos melanomas albergar mutaciones BRAF V600E ya puede de amplificación de la ciclina D1, mientras que otros pueden han perdido PTEN expresión; estos melanomas pueden ser particularmente susceptibles a la resistencia intrínseca manifestarse BRAF-inhibidor de la terapia. Dado que la resistencia a los inhibidores de BRAF se asocia a una continua dependencia de la RAS-RAF-MEK-ERK, inhibidores de MEK probablemente ser útil en el manejo de la resistencia adquirida a BRAF inhibidores

Figura 7. Vías de señalización intracelulares en el melanoma. Conocida por su importancia en la respuesta y resistencia de terapia dirigida. Fuente: Miller A, Martin C, Mihm J. *N Engl J Med* 2006;355:51-65.

diversa, que afectan a la piel y las mucosas u otros órganos.⁽³⁶⁾ No existe un tratamiento específico, y su evolución es crónica, llegando a mermar la calidad de vida de los pacientes y su supervivencia. La incidencia de EB se estima en 0,07 y menos de 0,41 por millón,⁽³⁶⁾ transmitida de forma autosómica dominante o recesiva y causada por una alteración de las proteínas de la unión epidermodérmica, que altera la cohesión de la dermis con la epidermis, hecho que da lugar a la formación de ampollas y erosiones cutáneas y mucosas. Se distinguen tres tipos de epidermolísis bullosa según el nivel de formación de ampollas: EB epidermolíticas o simples (EBS), en las que la ampolla se localiza a nivel intraepidérmico, justo en las células de la capa basal; EB de la unión o junturales (EBJ), en las que la ampolla se localiza a nivel de la membrana basal; EB dermolíticas o distróficas (EBD), en las que la ampolla se localiza por debajo de la membrana basal a nivel de las fibrillas de anclaje.⁽³⁷⁾

Estos pacientes son portadores de proteínas defectuosas porque los genes que las codifican tienen errores en el código. Existen 3 tipos principales de EB y 10 genes que codifican las proteínas de la piel: keratinas 14 y 5, plectin (epidermolísis ampollar simple), colágeno VII (EB distrófica recesiva y EB distrófica dominante) lamininas, integrinas, colágeno XVII (EB juntural). El objetivo es la modificación con genes no defectuosos que pudieran fabricar dicha proteína de forma correcta, o células que contengan el gen correcto para que produzca la proteína.^(37,38)

En el año 2006 se reportó el primer paciente con EB de unión tratado con terapia génica "ex vivo"; fue un transplante autólogo de piel previamente corregida en el laboratorio por la introducción del gen faltante. Después de 4 años de seguimiento, esa lámina de piel corregida ha seguido expresando el transgen funcional. Expresión de la laminina 332 funcional en la piel.⁽³⁷⁾ La estrategia del trabajo se puede observar en la figura 8.

Otra alternativa de terapia génica en EB, se realizó con la inhibición de la proteína defectuosa. Dos de los ejemplos hasta ahora son:

- 1.- *Terapia de "Desplazamiento y sustitución" con siARN para EBS: consiste en el desplazamiento del gen de la queratina defectuosa con siARN (pequeñas moléculas producto tipo farmacéutico).* Esta estrategia de "desplazamiento y sustitución" ha funcionado en ratones y en la actualidad DEBRA Internacional financia un programa en Escocia de 5 años de duración llamado "Terapias ARN para EBS".⁽³⁷⁾
- 2.- *Evitar la terminación prematura de la expresión génica.* Algunos defectos genéticos en EB causan que la maquinaria de fabricación de proteínas de las células de la piel deje de trabajar antes de que se haya formado completamente la proteína. Esta terapia se basa en que

existen algunos productos como el PTC124, que evitan que la maquinaria que produce proteínas reconozca las señales de acabado prematuro y que por tanto se pueda producir una proteína de dimensión normal.⁽³⁷⁾

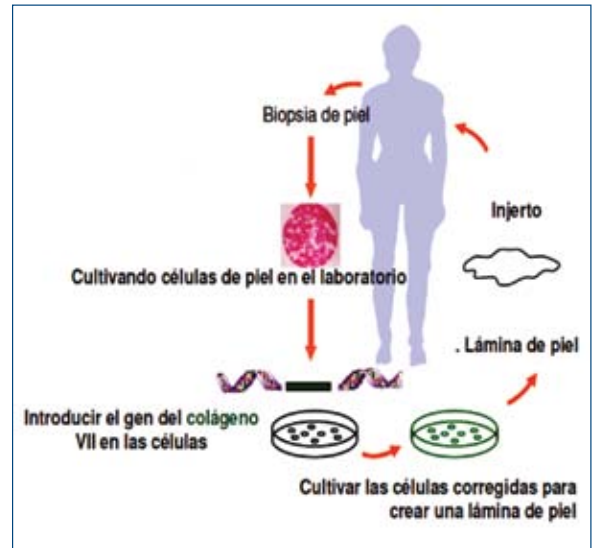


Figura 8. Terapia génica ex vivo en epidermolísis ampollar
Tomado de www.debra-international.org/.../Research_Update_2009_Espagnol.pdf

TERAPIA GÉNICA Y LINFOMAS CUTÁNEOS

Los pacientes en fase temprana de la enfermedad, limitada a la piel por lo general requieren terapias dirigidas con agentes tópicos incluyendo los cortico esteroides, medicamentos quimioterapéuticos, gel de bexaroteno, fototerapia, terapia láser, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab, entre otros. Cada uno de estos son efectivos, sin embargo, todos tienen algunas desventajas que se asocian con significativos efectos adversos.^(39,40,41) Hay desarrollos interesantes con compuestos antineoplásicos, como los retinoides, tazaroteno, imiquimod y el gen con medicamentos de terapia y con vectores construidos a partir de adenovirus, modificados para la producción de INF- γ . Estos vectores suministrados intramuscularmente, han dado buenos resultados en la inmunoterapia del LCCT (decir que enfermedad es?), pese a la toxicidad aguda que presenta.⁽⁴²⁾ Se ha ensayado terapia con vectores adenovirales: INF gamma, una citoquina con propiedades antitumoral inmunoestimulante, antiproliferativa y angiogénicas INF gamma γ recombinante intramuscular para la inmunoterapia del LCCT con prometedores tasas de respuesta, aunque se describe toxicidad aguda.^(43,44)

TG-1042 es un vector de adenovirus de replicación deficiente, que expresan INF γ . Se ha ensayado en lesiones de linfoma cutáneo (CL). Inyecciones intralesionales