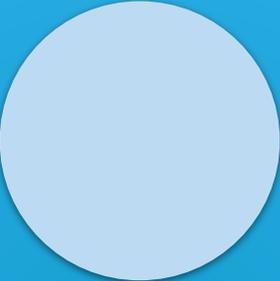




# TERAPIA GENÉTICA





La transferencia o introducción de material genético a una célula eucariótica con el propósito de alterar el curso de una enfermedad o corregir una alteración metabólica o genética.



Las enfermedades que pueden tratarse con esta estrategia terapéutica son variadas e incluyen desde las monogénicas hereditarias hasta las poligénicas e infecciosas.

Manipulación genética.

Adición génica.

- consiste en insertar un gen funcional que exprese la proteína terapéutica en el tejido indicado.

Supresión génica.

- El objetivo es disminuir o anular la expresión de algún gen o genes a través de ARN de ARNi, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

# Clasificación

Según el tipo celular.

Terapia génica en células germinales.

- También denominada terapia eugénica, va dirigida a células germinales (espermatozoides y óvulos).

Terapia génica en células somáticas.

- En este tipo de estrategia, uno o más tejidos son sometidos a terapia génica mediante administración sistémica, tratamiento directo o previa extirpación del tejido.

## Según la metodología.

### Terapia génica ex vivo.

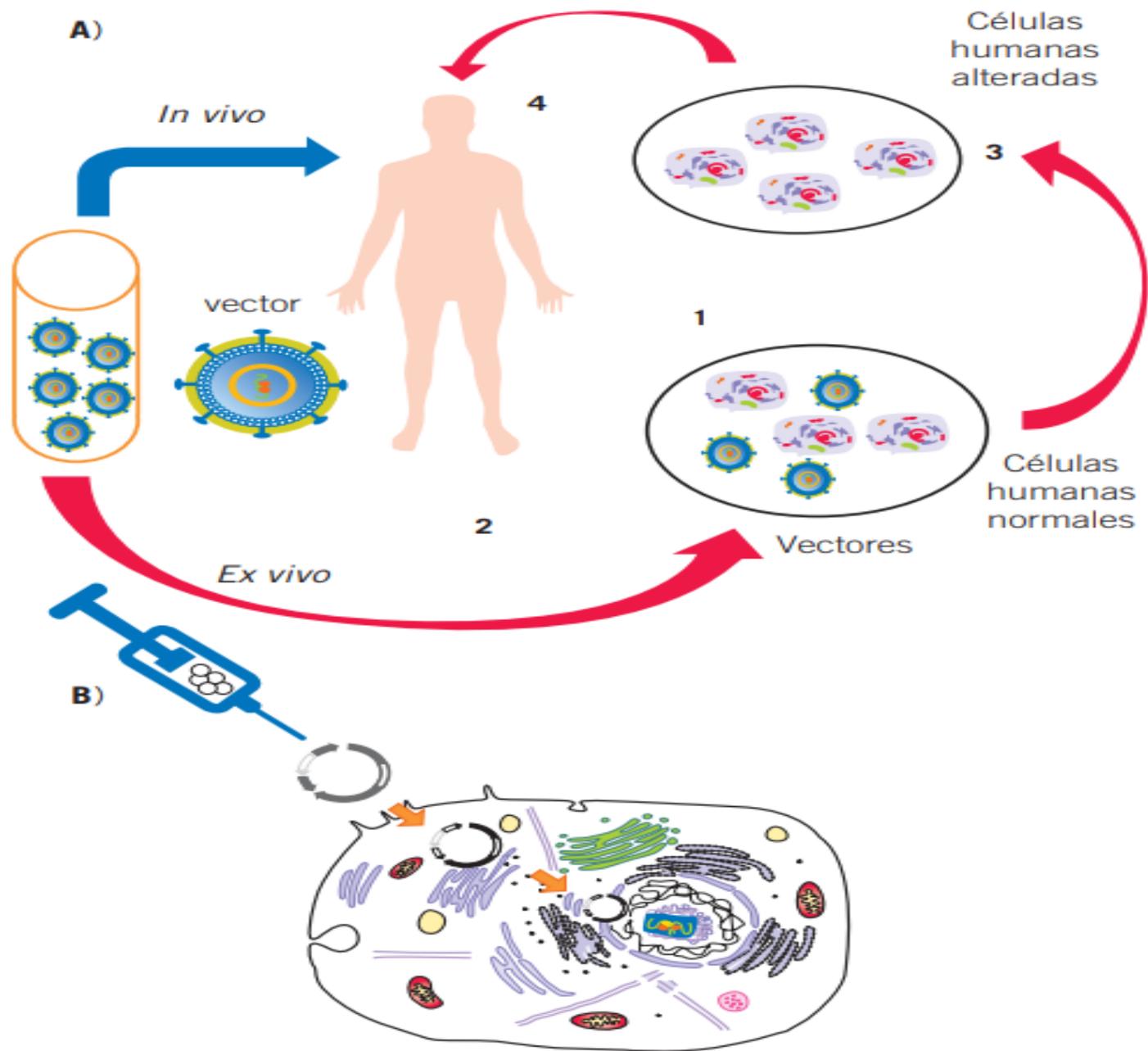
Este método se basa en la obtención y el aislamiento de un tipo celular específico del paciente que se va a tratar; estas células se cultivan en el laboratorio, en donde se les introduce el gen terapéutico con ayuda de un vector.

### Terapia génica in vivo.

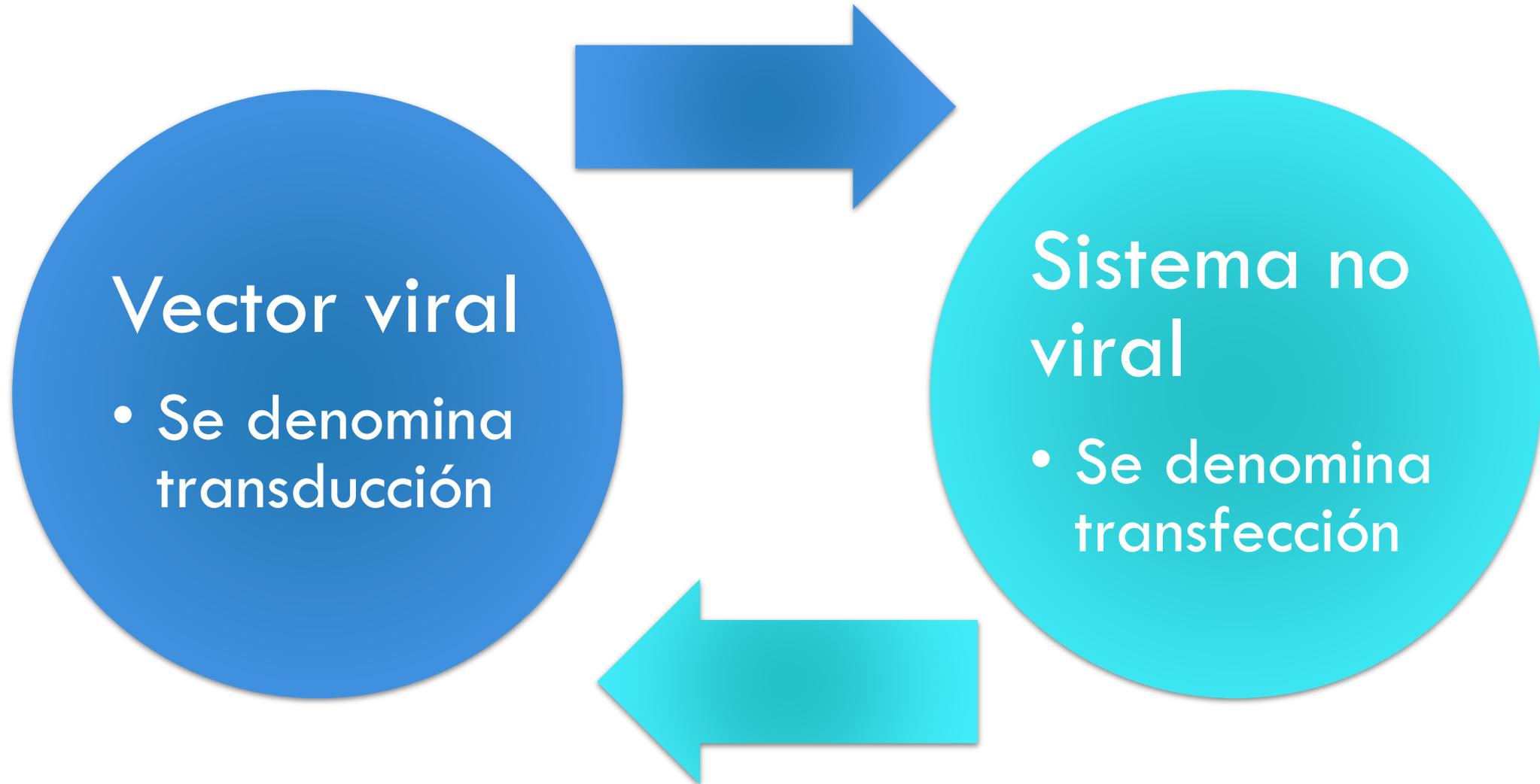
Este método consiste en la introducción directa del gen terapéutico al torrente sanguíneo del paciente, que llegará al órgano blanco, o bien se administra directamente en el órgano o tejido.

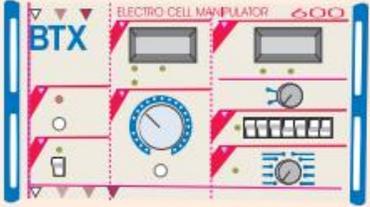
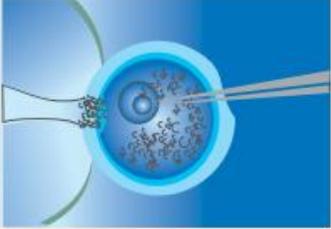
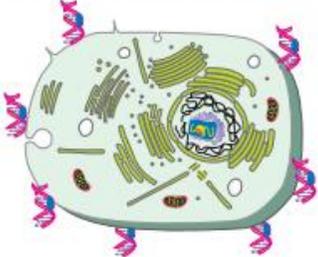
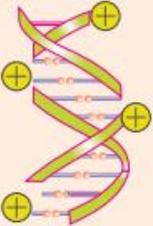
# Terapia génica in situ

- Se trata de una microinyección que introduce el ácido nucleico directamente a la célula, para lograr la obtención de organismos recombinantes.



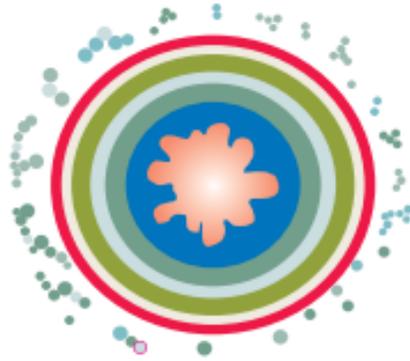
# Métodos de envío de genes



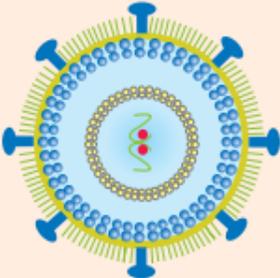
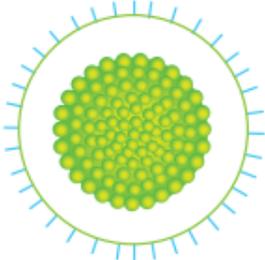
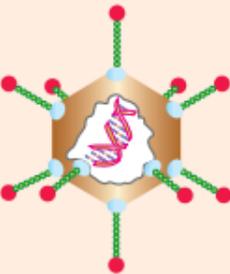
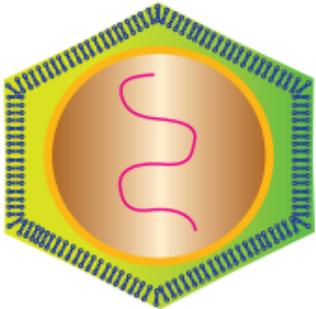
		Equipo/Material	Características
Métodos físicos	Electroporación		Este método emplea un aumento de conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado de manera externa. Es habitual en biología molecular como forma de introducción de diferentes sustancias en las células.
	Bombardeo de partículas		El bombardeo de partículas constituye una técnica efectiva de transferir genes tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> . En este método físico el plásmido o porción de ADN es recubierto en su superficie por gotas de oro o tungsteno, de 1 a 3 micras de diámetro. Estas partículas, aceleradas por una descarga eléctrica de un aparato o por un pulso de gas, son disparadas hacia el tejido.
	Inyección directa de ADN		Otra alternativa para el bombardeo de partículas es la inyección directa del ADN o ARN puro circular y cerrado covalentemente. Una desventaja fundamental que cabe señalar es que los niveles y persistencia de la expresión de genes dura un corto periodo.
	Precipitación con fosfato		Los fosfatos forman un complejo con el ADN y éste se deposita sobre la membrana celular, el cual es endocitado.
	DEAE-dextrán		DEAE-dextrán es utilizado en células animales para transfectar ADN foráneo. El ADN se añade a la solución donde se une e/o interactúa con ADN cargado negativamente. Este procedimiento se usa para una transfección transitoria útil en varios estudios de biología molecular

Métodos  
químicos

Liposomas



Los liposomas catiónicos consisten en la mezcla de un lípido catiónico de carga positiva y varias moléculas de ADN con carga negativa, debido a los fosfatos de la doble hélice

	Equipo/Material	Características
Métodos virales		<p>Estos virus, una vez en el interior de la célula infectada, copian su genoma, constituido por ARN, en forma de ADN bicatenario; posteriormente, este último fragmento de ADN se integra en el genoma de la célula infectada. El genoma viral permanece integrado en un cromosoma celular, mientras produce nuevos virus continuamente, transmitiéndose de generación en generación de la misma manera que cualquier otro gen celular. Sin embargo, cabe resaltar que estos vectores presentan como desventaja una inserción al azar, lo cual podría conducir a derivaciones oncogénicas.</p>
		<p>Estos vectores presentan un material genético compuesto por ADN bicatenario lineal. El potencial de estos virus como vectores génicos recae en la habilidad tanto de llevar grandes secuencias de ADN, como para establecer infecciones latentes de larga duración. Los herpesvirus son muy diversos y varían en su tamaño de genoma, así como en la organización del mismo, lo cual conlleva a tener diferentes clases de ambos.</p>
		<p>Los vectores adenovirales son virus no envueltos de doble cadena de ADN. Son deficientes en replicación y requieren de un sistema de complementación que es la línea celular HEK293 (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>) modificada para que produzca constitutivamente los elementos E1 virales, que son suprimidos en el vector adenoviral. Tienen la ventaja de que se logra con ellos un alto nivel de expresión, son relativamente fáciles de manejar, infectan un buen número de tipos celulares y tienen la capacidad de infectar células que no se están dividiendo.</p>
		<p>El virus AAV es un virus no patógeno muy común en el humano (más de 80% de la población posee anticuerpos contra el AAV). Su principal interés consiste en que es el único virus conocido de mamífero que se integra específicamente en una región concreta del genoma de la célula, en el brazo corto del cromosoma 19 humano. Actualmente, su limitación principal es que los vectores son difíciles de desarrollar en grandes cantidades y se requiere un gran número de partículas víricas para transducir las células, para lo cual hasta ahora no se han desarrollado las células de encapsidación ideales y el tamaño del gen que pueden integrar es muy limitado (menos de 4 kb).</p>

# MÉTODOS NO VIRALES

Basan su acción en la entrega directa de la información genética dentro de la célula blanco.

Estos sistemas muestran una baja toxicidad.

Su costo es bajo.

La transferencia de genes es generalmente ineficiente y transitoria.

Estos procedimientos se dividen, en físicos y químicos

# FISICOS

## Electroporación

- Se utiliza para cultivos celulares y consiste en el uso de una celda donde se colocan las células, que se adapta a un electroportador que genera una corriente eléctrica del orden de milivoltios, con una duración de milisegundos, para generar orificios en la membrana celular.

## Bombardeo de partículas

- Es el método de elección para la transfección de células vegetales, ya que la pared celular es un obstáculo físico que bloquea de manera natural la transducción.

## Microinyección

- Consiste en la inyección directa de ADN en el núcleo celular mediante una microjeringa y un microscopio óptico, llamado micromanipulador.

# QUIMICOS

## Precipitación con fosfato de calcio.

- Se utilizan para la transferencia de información genética en células tanto bacterianas como eucariotas. Éstos consisten en formar un precipitado insoluble entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos.

## DEAE-Dextran

- Esta técnica difiere de la del fosfato de calcio en que se emplea sólo para la transfección transitoria de células y se utiliza de manera eficiente sólo en algunas líneas celulares eucariotas; debido a su toxicidad en otras no resulta adecuada.

## Liposomas

- Esta técnica se basa en el uso de moléculas lipídicas de carga neta altamente positiva que interactúan con el esqueleto fosfatado de la molécula de ADN.

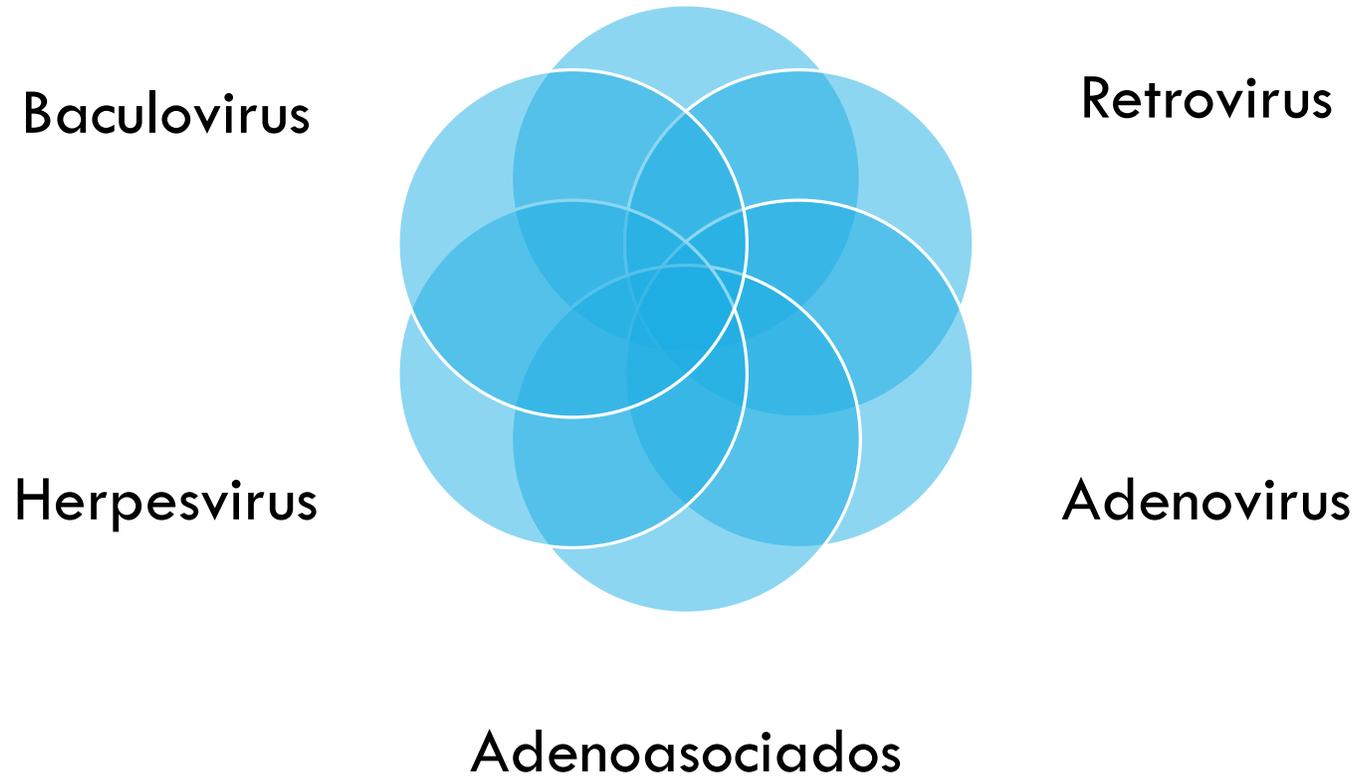
# TRANSFERENCIA DE GENES POR UN VECTOR VIRAL

Los vectores virales son virus manipulados genéticamente para eliminar su capacidad autorreplicativa y en su genoma puedan incorporar genes terapéuticos.

- Emplean los mecanismos naturales de infección viral para introducirse en la célula e introducir el gen terapéutico que contienen.

ofrecen grandes ventajas respecto a los no virales, y en general presentan una habilidad elevada para transducir células, por lo que son los modelos de elección para protocolos clínicos de terapia génica in vivo.

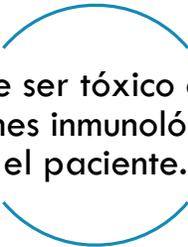
Los virus que se  
utilizan como  
vectores virales



# LINEAMIENTOS PARA SER UN VECTOR IDEAL



Su producción debe ser fácil y eficiente.



No debe ser tóxico o inducir reacciones inmunológicas en el paciente.



Debe ser capaz de infectar a células tanto en reposo como en replicación.



Debe transducir tipos celulares de manera específica.

los vectores pueden clasificarse como vectores integrativos o no integrativos.

## Retrovirus

- Constituyen el grupo viral más desarrollado como vectores para protocolos clínicos. Los retrovirus recombinantes más usados son Lentivirus, derivados del virus de la leucemia murina.

## Herpes virus

- Son virus de doble cadena de ADN, de la familia Herpesviridae; el género más usado como vector es Simplexvirus. El herpes virus puede ser una herramienta muy valiosa en células del sistema nervioso central, ya que sus células diana son las neuronas y se trata de un virus integrativo.

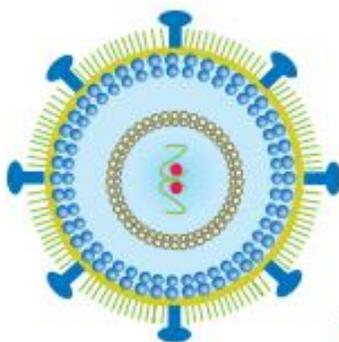
## Adenovirus

- Los adenovirus son miembros de la familia Adenoviridae. Se trata de virus de ADN de doble cadena, con una longitud de 30 a 35 kb, y pueden aceptar hasta 8 kb de material genético exógeno.

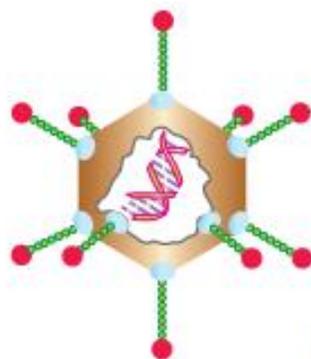
## Virus adenoasociados

- Los AAV son virus relativamente pequeños, de 45 a 60 nm de diámetro, cuyo ADN es de cadena sencilla, con una longitud de 4.7 kb. Tienen una capacidad limitada para la inserción de genes, de sólo 1 kb, y son capaces de infectar tanto células en reposo como en replicación.

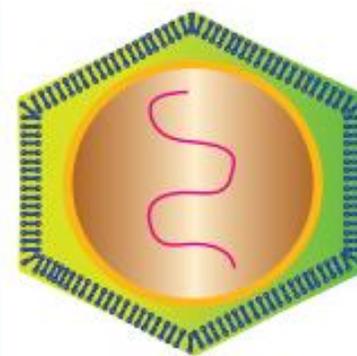
## Virus



Retrovirus



Adenovirus



Adenoasociado

## Ventajas

- Transducción eficaz.
- Integración genómica y expresión persistente.
- Permite la expresión a largo plazo del gen terapéutico.
- Penetra efectivamente en las células de división.
- Se integra en material genético de la célula huésped sin introducir los genes virales.

- Se logra un alto nivel de expresión.
- Relativamente fáciles de manejar.
- Infechan un buen número de tipos celulares (incluyendo células que no se están dividiendo).
- Leve efecto como agentes patógenos en el ser humano (p. ej., resfriados).

- Generan baja respuesta inmune.

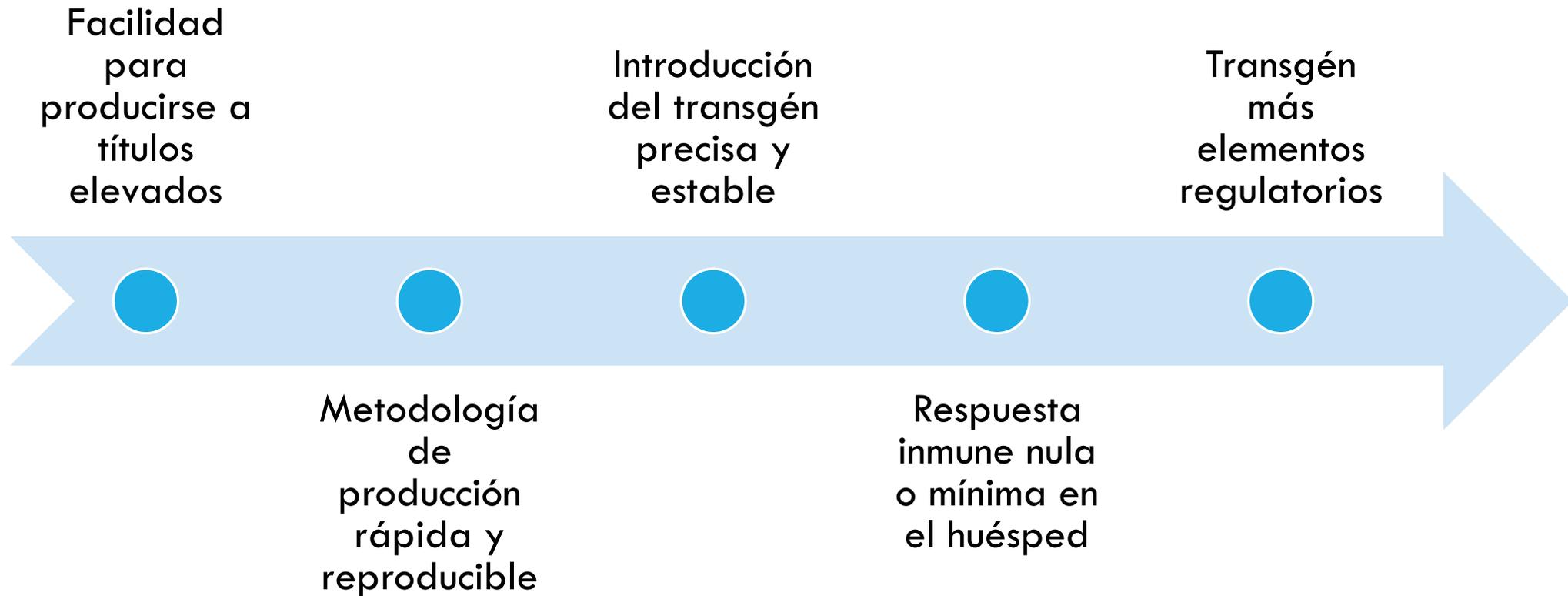
## Desventajas

- Dependencia de la división celular.
- Dificultad para controlar y asegurar la expresión.
- El tamaño de los genes que se introducirán es limitado.
- Existe potencial de daño al genoma, por integrarse en éste al azar.

- Expresan varias proteínas virales que resultan inmunogénicas.
- La introducción repetida no es satisfactoria normalmente, a menos que la exposición inicial esté acompañada de una modulación inmunológica para suprimir la respuesta inicial a las proteínas de la cápsula adenoviral.

- Requieren de los genes virales para integrarse.
- Sólo transducirán células en presencia de un adenovirus.
- El tamaño del gen que pueden integrar es muy limitado (menos de 4 kb).
- Necesitan un gran número de partículas víricas para transducir las células.
- La preparación de partículas víricas de vectores AAV es difícil.

# CARACTERÍSTICAS DESEABLES DE UN VECTOR



# ARN DE INTERFERENCIA

es un mecanismo que involucra el empleo de secuencias específicas de ARN de doble cadena para un gen específico, con la finalidad de bloquear su expresión.

Esta técnica comenzó en la década de 1980, cuando se observó que algunas moléculas de ARN pequeño podían anular la expresión de varios genes en células de plantas y animales, al unirse por complementariedad de bases a las cadenas de ARN mensajero (ARNm) e inhibir el proceso de síntesis de proteínas.

# APLICACIONES CLÍNICAS DE LA TERAPIA GÉNICA

Terapia génica  
contra agentes  
infecciosos

Terapia génica  
contra el  
cáncer

Terapia génica  
contra  
enfermedades  
monogénicas

Terapia génica  
contra la  
cirrosis  
hepática