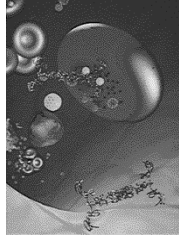
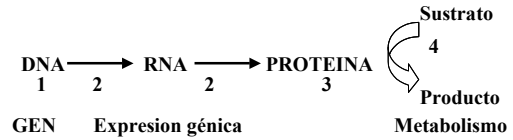


## Terapia molecular

Diseño de nuevas moléculas (DNA, RNA, proteínas, compuestos químicos) en base al conocimiento de la estructura y función de las dianas moleculares, cuya función se desea interrumpir, disminuir, corregir o aumentar para obtener un efecto terapéutico en el individuo.

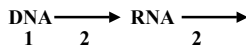


## ¿Cuales son los niveles de acción de la Terapia Molecular?



### Niveles de intervención terapéutica molecular

1. GEN: Terapia génica o Terapia por transferencia de genes
2. Expresión génica: (Aumento o disminución)
  - Control de transcripción: Metilación, desacetilación (disminución) y demetilación y acetilación (aumento) de histonas.
  - Control de factores de transcripción
  - Control de splicing de pre-mRNAs
  - Control del transporte y de la traducción de mRNAs

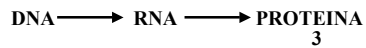


### 3. Proteína

Reemplazamiento de proteína: extracelular o intracelular. Suministrada extracelularmente a nivel sistémico o dirigido a células específicas.

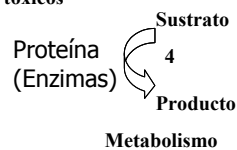
Ej: Maquinaria proteica de señalización celular

Primeros mensajeros: hormonas, factores de crecimiento  
 Receptores  
 Maquinaria de Transducción  
 Segundos mensajeros  
 Cascadas de proteína quinasa  
 Control de expresión génica

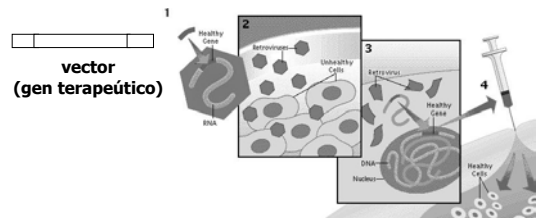


### 4. Manipulación metabólica

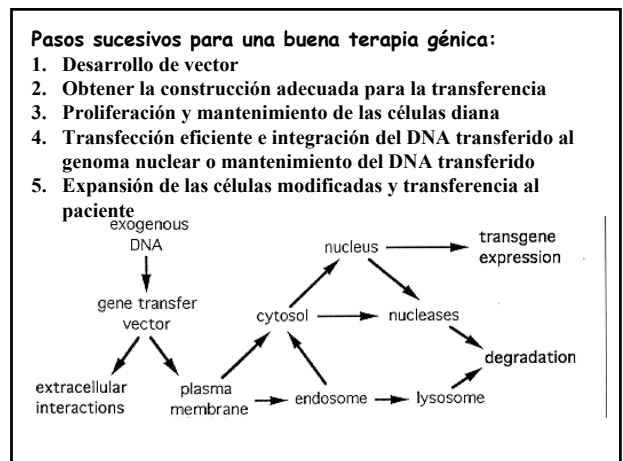
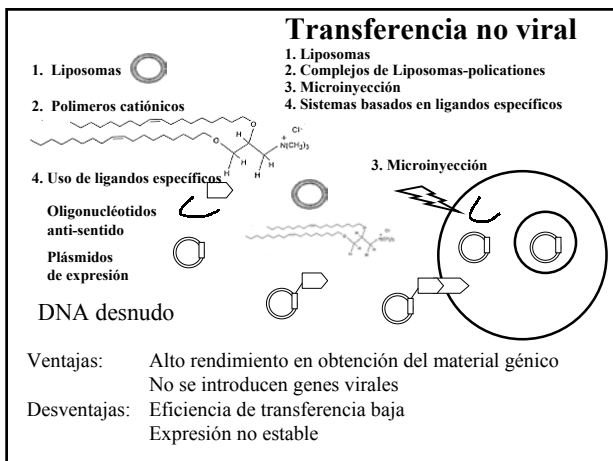
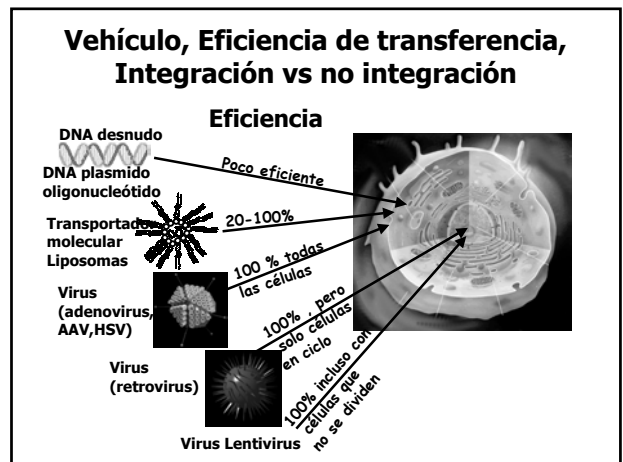
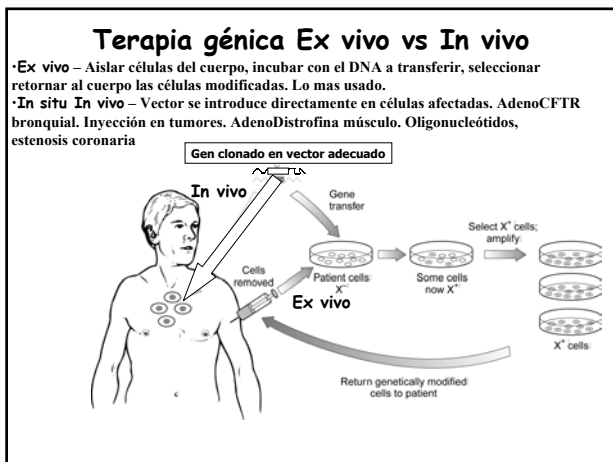
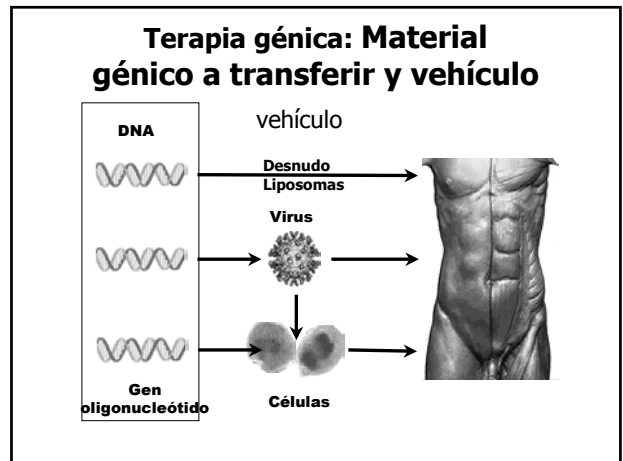
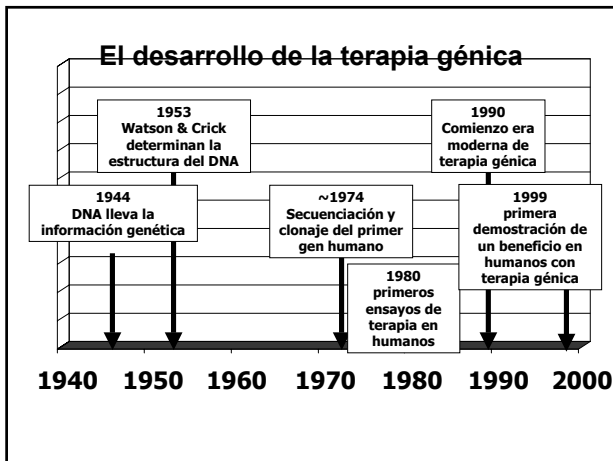
- Restricción en la dieta
- Reemplazamiento de metabolitos o cofactores
- Inhibición de rutas metabólicas
- Deplección de metabolitos tóxicos



## ¿Qué es la terapia génica?



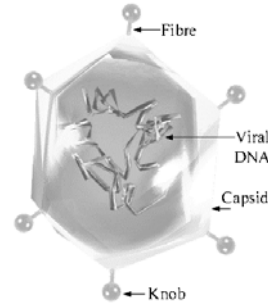
La expresión de un nuevo gen dentro de una célula diana resultando en un cambio en las características funcionales de la célula que produce un beneficio terapéutico para el paciente



### Vectores virales

- **virus DNA**
  1. Adenovirus
  2. Adeno-associated viruses (AAV)
  3. Herpes simplex (HSV)
- **virus RNA (Retrovirus, lentivirus)**
  1. Virus leucemia murina (MuLV)
  2. Human immunodeficiency viruses (HIV)
  3. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV)

### Adenovirus



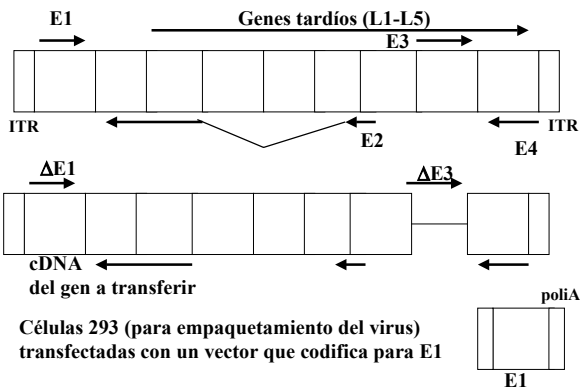
#### Ventajas

1. Alta eficiencia de infección
2. Alto nivel de expresión génica
3. Puede acomodar DNAs algo mayores

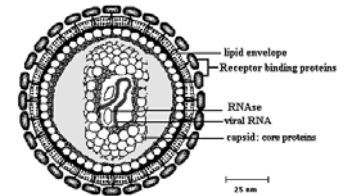
#### Desventajas:

1. Expresión transitoria
2. Difícil conseguir que se infecten solo las células a tratar
3. El virus infecta muchos tipos celulares
4. Reacción inmunológica
5. Seguridad

### Vectores adenovirales



### Retrovirus



#### Ventajas:

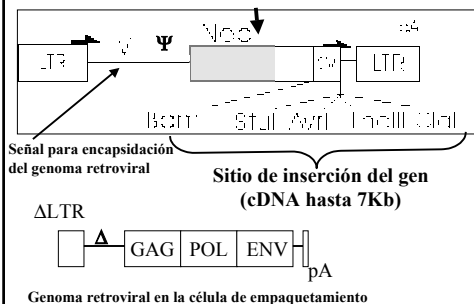
1. Integración en el genoma al azar
2. Amplio espectro de huéspedes
3. El transgen se expresa durante tiempos largos

#### Desventajas:

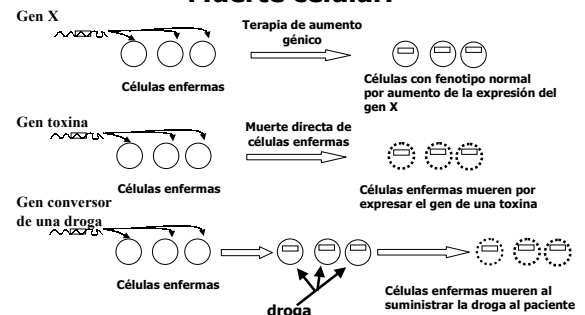
1. Genes que se pueden insertar pequeños
2. Infectividad limitada a células que puedan proliferar in vitro
3. Inactivación por la cascada del complemento
4. Problemas de seguridad

### Síntesis de un vector retroviral de terapia génica

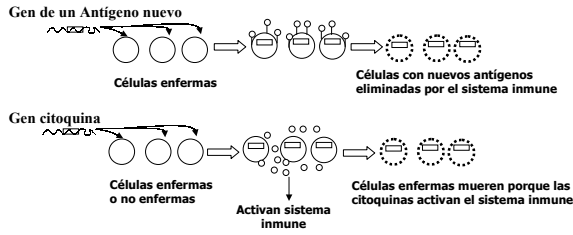
Marcador selectivo de resistencia para aislar las células que incorporan el gen



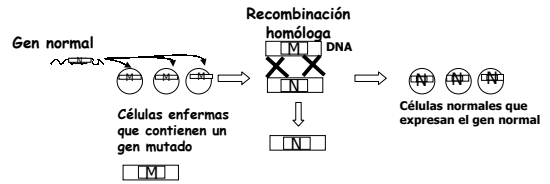
### Objetivos de la terapia génica. Aumento (recuperar) función. Muerte celular.



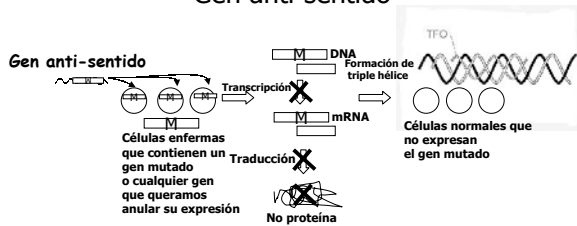
## Objetivos de la terapia génica Hacer responder al sistema inmune



## Objetivos de la terapia génica reemplazamiento génico

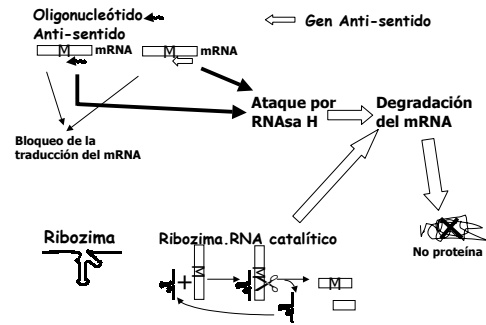


## Objetivos de la terapia génica Inhibición de la expresión génica Gen anti-sentido



Además inhibe la expresión por mecanismos Similares a oligonucleótidos anti-sentido

## Objetivo de la terapia génica Inhibición de la expresión génica oligonucleótido anti-sentido y ribozimas



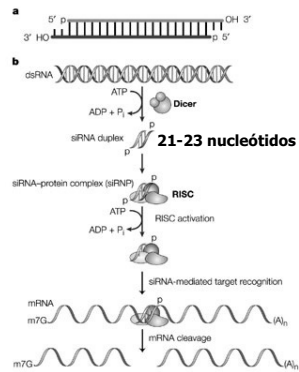
## Objetivo de la terapia génica Inhibición de la expresión génica RNA interferente

siRNA: Small Interfering RNA. RNA interferente:

-Dicer: Enzima similar a Rnasa II que genera el duplex siRNA a partir de dsRNA.

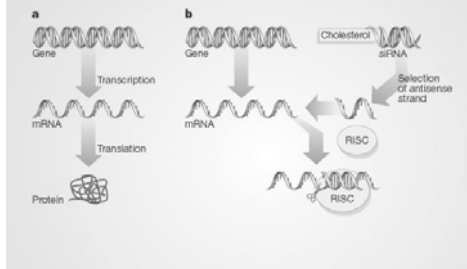
-RISC (RNA Induced Silencing Complex) Es un complejo que produce el desplazamiento de la hebra del RNA con sentido del duplex de siRNA y por tanto luego se puede dirigir al mRNA correspondiente y por la acción de endonucleasas y exonucleasas degradar el mRNA específico al que va dirigido.

siRNA mechanism



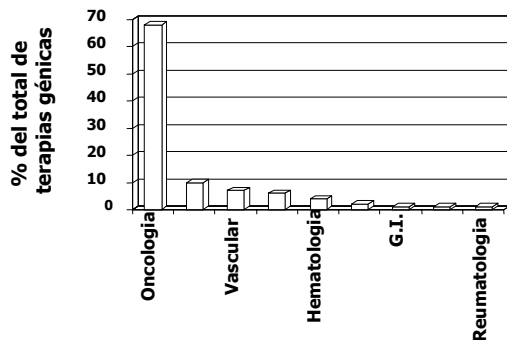
## siRNA modificado con colesterol permea mejor en las células y permite terapia sistémica

Colesterol unido al 3' de la cadena con sentido del siRNA Chol-siRNA

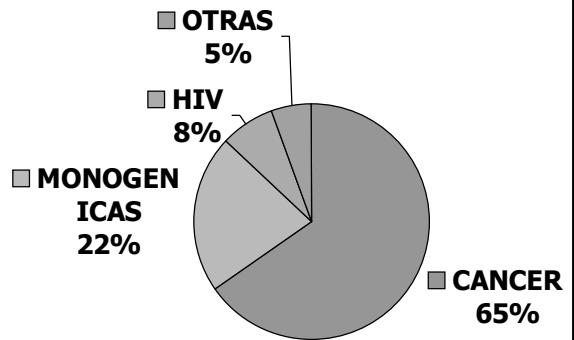


Nature. 2004 Nov 11;432(7014):173-8.

### Terapia génica por áreas médicas



### Terapias génicas en marcha



### Algunos problemas de la terapia génica

Reacción Inmunológica

Transformación

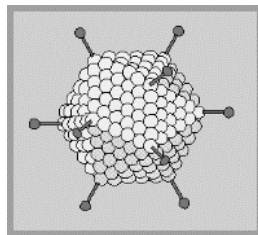
### Problemas de la terapia génica



- Jesse Gelsinger, 18
- Comienza en 1999 terapia génica contra déficit de ornitina transcarbamilasa (OTC)
- Murió 4 días después

### Adenovirus

- Vector para transferir el gen normal OTC
- Inyectado en sangre llegó al hígado
- Jesse tuvo una reacción inmune aguda contra el virus

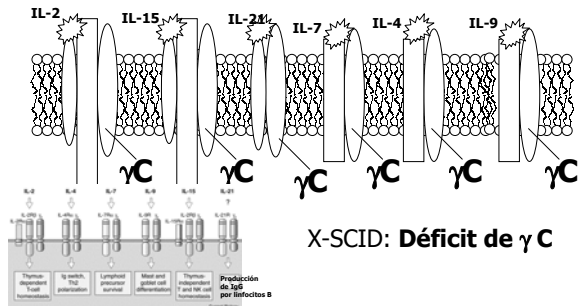


### Reacción fatal

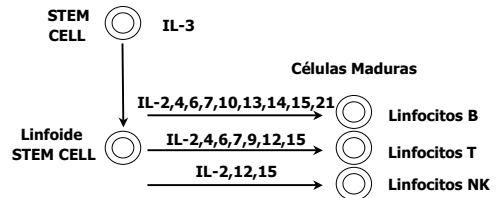
- Virus se adhieren a macrófagos sensibilizados
- Macrófagos liberan grandes cantidades de interleuquinas
- Fallo hepático

## Terapia génica de SCID ligada a X Severe Combined Immunodeficiency

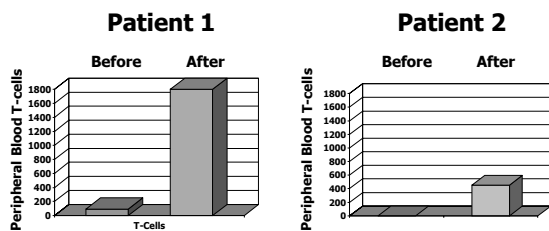
IL-2R IL-15R IL-21R IL-7R IL-4R IL-9R



## Citoquinas requeridas para la formación de células linfoides



## Resultados de la terapia génica en SCID ligado al X



## Interrupcion de la terapia génica de X-linked SCID

Vector usado: retrovirus con cadena  $\gamma C$   
Tratamiento ex-vivo: infección de células CD34+ de medula ósea y reinyección al paciente

Problema: En un paciente se ha producido un linfoma linfoblástico T.

CAUSA: El retrovirus se ha insertado próximo al gen LMO-2. Cuyas mutaciones o aumento de expresión de este factor de Transcripción produce linfomas T

Se ha interrumpido el tratamiento: en USA y Francia. Se ha comenzado de nuevo.

## Consideraciones éticas de la terapia génica

- Uso de la tecnología de transferencia génicas para otras aplicaciones: mejora funcional o fines "cosméticos". Tratamiento de la calvicie por transferencia génica en células foliculares, aumento de estatura por transferencia de hormona del crecimiento, aumento de masa muscular para atletas.
- In utero terapia génica somática - solamente deben tratarse enfermedades muy graves y balancear muy bien el riesgo para la madre y para el feto.
- Abuso del uso de las técnicas de clonaje para el clonaje reproductivo.