

Nuevas herramientas terapéuticas en enfermedades genéticas



EMILIE CORNEIG-LE GALL

Nefróloga en el CHRU
(Hospital Regional
Universitario) de Brest

En este artículo intentaré explicar las nuevas herramientas terapéuticas en enfermedades genéticas de una manera relativamente sencilla. Voy a empezar con cosas muy básicas porque si queremos hablar de terapias genéticas, tenemos que empezar con nociones simples de genética.

1. Introducción: De la mutación a la enfermedad

¿Cómo funciona?

Abordaremos la cuestión de cómo se pasa de una mutación genética a la enfermedad y qué es el ADN:

—El ADN o ácido desoxirribonucleico, contiene instrucciones bajo una forma química que son los genes necesarios para mantener la integridad de una célula, de un tejido o de un organismo. Este ADN está presente en forma de cromosomas en el núcleo de las células.

—El gen es un segmento de ADN que permite la producción de una o más proteínas o de una o más moléculas de ARN.

—En el cuerpo humano hay decenas de miles de millones de células y en la mayoría de estas células hay un núcleo y en el núcleo de cada célula hay alrededor de dos metros de ADN, si lográsemos desplegarlo. Este ADN está condensado en forma de 46 cromosomas, de hecho 23 pares: 22 pares de cromosomas no sexuales o autosomas y un par de cromosomas sexuales o gonosomas; XX para mujeres y XY para hombres. Dentro de estos cromosomas hay veinte mil genes que contienen el código para la fabricación de proteínas. La parte codificante del genoma, es decir, la parte que da lugar a las proteínas es el 1% del ADN.

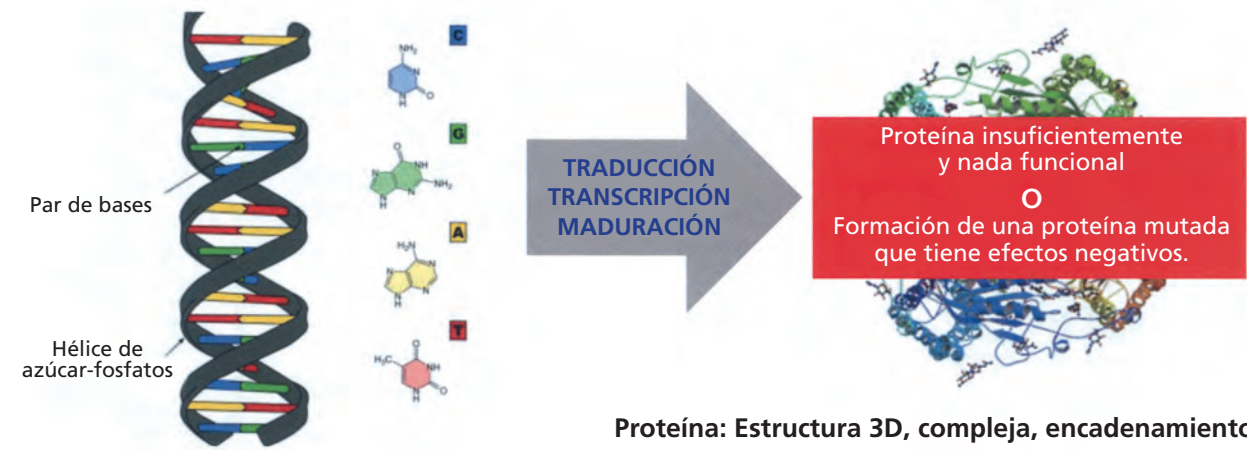
¿Cómo se pasa de una mutación a una enfermedad?

Primero tenemos que entender cómo pasamos del ADN a la proteína y luego hablar sobre cómo podemos influir en estas diferentes etapas.

El ADN es una sucesión de cuatro bases diferentes Adenina, Citosina, Guanina y Timina en un

orden muy específico y organizado en forma de doble hélice. La decodificación de este ADN es lo que se llama la "traducción" que dará lugar a una especie de proteína inmadura, que luego adquirirá una forma madura y dará lugar a una proteína con una compleja estructura tridimensional en 3D y que comprende la secuencia de 20 aminoácidos.

Introducción: de la mutación a la enfermedad, ¿cómo funciona?

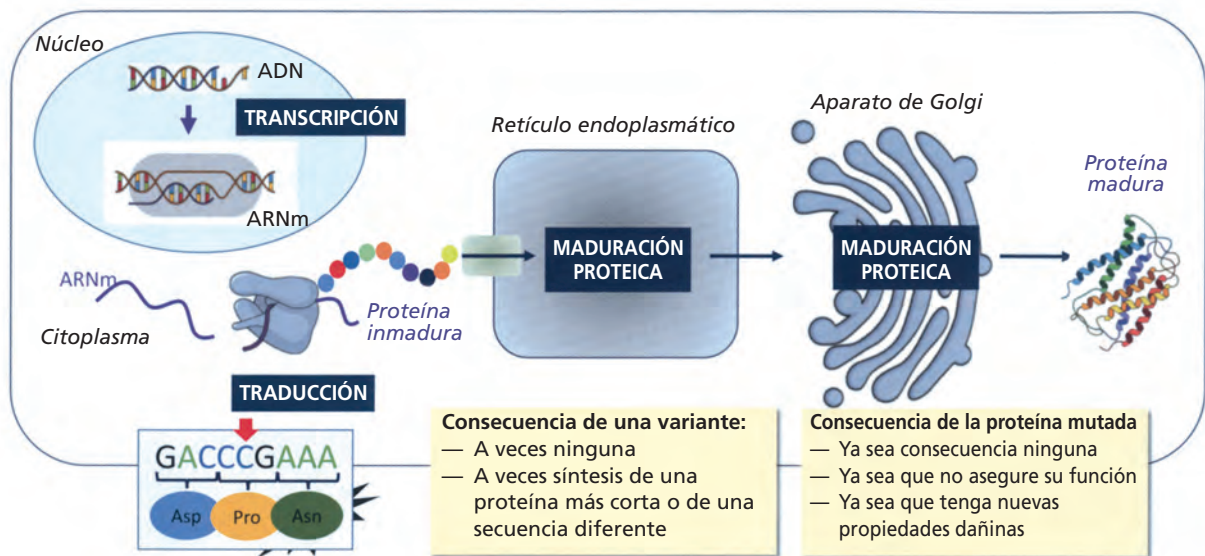


ADN estructura doble hélice
4 bases: Adenina, Citosina, Guanina, Timina
ACGT

Proteína: Estructura 3D, compleja, encadenamiento de 20 aminoácidos

Prolina, alanina, fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina, serina, treonina, tirosina, histidina, glutamina, asparagina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, triptófano, arginina, glicina

Introducción: del gen a la proteína, ¿cómo funciona?



Aquí se muestra un resumen de estas diferentes etapas.

El primer paso es la transcripción y sucede en el núcleo: paso del ADN a la forma transcrita llamado ARN mensajero.

El segundo paso es la traducción del ARN mensajero, que se ha exportado al citosol, será leído por esta especie de pequeña máquina llamada ribosoma que leerá el ARNm en un patrón de tres letras. Para cada triplete de letras, a partir de un código genético corresponderán tres letras específicas para cada aminoácido. Es como si imagináramos una perla de un collar: cada grupo de tres letras dará un aminoácido, una cuenta en un collar, que formará de esta manera una proteína inmadura.

El siguiente paso es la maduración de proteínas a nivel del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Si todo va bien, vamos a tener una proteína madura, es decir, nuestro pequeño collar inicial pero doblado correctamente y con la forma correcta para asegurar su buen papel donde debe asegurarlo.

Entonces, si, por ejemplo, tenemos una mutación y tenemos un triplete de nucleótidos AAA, transformados en TAA: este ya no contiene la misma información, con AAA teníamos un aminoácido Lisina (la perla verde), y para TAA corresponde a la orden "stop", es decir, ¡alto, parar! Entonces vamos a tener la síntesis de una proteína que será más corta.

Otra situación sería aquella en la que tenemos una perla arginina (CGG). Si cambiamos una de estas letras y ponemos CCG, tendremos una perla diferente, una prolina (perla amarilla), por lo que nuestra proteína tendrá una secuencia distinta.

¿Qué consecuencias tienen las variaciones ortográficas en la síntesis de una proteína?

Muy a menudo ninguna. A veces grafías diferentes dan lugar todas a la misma proteína. En francés, por ejemplo, se puede escribir la palabra llave de diferentes formas: *c.l.é* ó *c.l.e.f.* De la misma manera, en el genoma existen diferentes formas de escribir lo mismo. Otras veces, estas variaciones ortográficas dan lugar a la síntesis de una proteína más corta (o la ausencia total de proteína) en función de que, si tiene una "alto o parar" como en el ejemplo anterior, o secuencias diferentes (una perla en el collar ha sido reemplazada o eliminada o agregada).

¿Cuáles son las consecuencias sobre la aparición de una enfermedad?

Muy a menudo no hay consecuencias, podemos tener una proteína de secuencia diferente pero que no da pie a ninguna enfermedad.

Sin embargo, otras veces esa proteína no va a asegurar su función y el defecto de esa función de la proteína va a dar lugar a una enfermedad.

En otras ocasiones esta proteína tiene nuevas propiedades, propiedades que pueden ser dañinas y hacer que sea responsable de una enfermedad.

2. Nuevas herramientas terapéuticas en las enfermedades genéticas

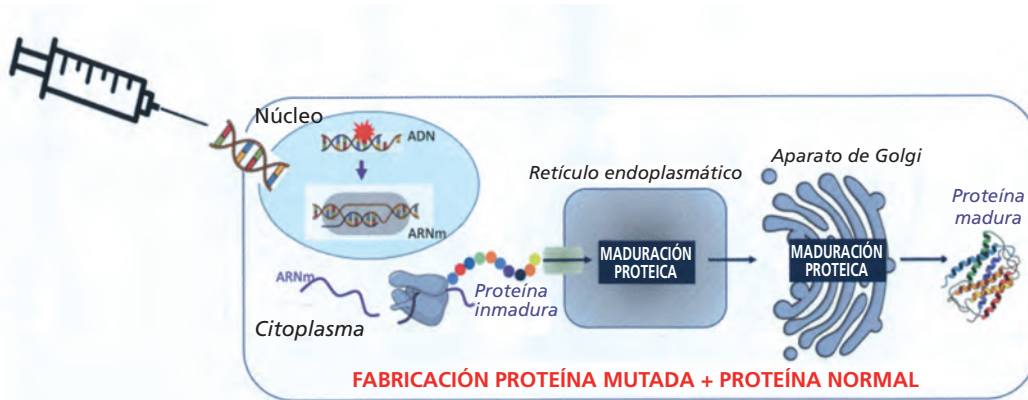
Es interviniendo durante estas diferentes etapas que definiremos las diferentes terapias genéticas.

Diferentes tipos de terapias:

—La terapia genética es en la que la gente suele pensar, de la que escuchamos hablar más, al menos los últimos 20 años, y de la que se tienen noticias recientes.

Terapia génica

Principio: aportar una nueva función funcional del gen que lleva la mutación a las células diana adecuadas



Ejemplos: Déficit inmunitario combinado severo (enfermedad de niños burbuja)
Atrofia espinal tipo 1

—La segunda técnica CRISPR-Cas9, estas son las famosas tijeras de ADN.

—También hablaremos de ARN interferentes y luego finalmente de las chaperonas.

2.1. Terapia génica

¿Qué es la terapia génica?

El principio es proporcionar una versión funcional del gen que porta la mutación dentro de las células diana adecuadas.

Volviendo a las distintas etapas mencionadas anteriormente, en la imagen que se muestra a continuación yo puse una jeringa, pero podría ser diferente dependiendo de la célula diana, por ejemplo, para células bronquiales, uno puede imaginar un aerosol.

Se introduce en la célula una versión no mutada del gen y por lo tanto, la célula continuará fabricando a partir del ADN del paciente la proteína mutada, pero producirá igualmente más proteínas normales gracias al material proporcionado.

Por lo tanto, los próximos pasos serán los mismos. Se tendrá la fabricación de la proteína mutada dado que la mutación permanece en su lugar, pero también tendremos la fabricación de proteínas normales. El ejemplo más comentado es la inmunodeficiencia combinada grave: la famosa enfermedad del niño burbuja. Probablemente hayáis oído hablar de ella y de las primeras pruebas, en la década de 2000. Y luego un ejemplo más reciente que es la atrofia muscular medular espinal tipo 1. Solo voy a decir una palabra al respecto, ya que creo que esto es importante: es una de las primeras terapias génicas que se han comercializado recientemente.

Es una enfermedad muy rara y grave, los niños afectados tienen una enfermedad de transmisión autosómica recesiva: portan una mutación heredada de ambos progenitores para poder desarrollar la enfermedad. Y estas mutaciones conducen a la ausencia de un factor muy importante para la supervivencia de las neuronas motoras: la proteína de supervivencia de las neuronas moto-

ras. Por tanto, hay una degeneración de las neuronas destinadas a las células musculares. Estos niños tendrán un déficit muscular, así como un déficit de los músculos respiratorios, necesitarán ventilación asistida a una edad muy temprana de su vida, el pronóstico de esta enfermedad es extremadamente sombrío. Lo que se ha desarrollado es reportar este factor tan importante para la supervivencia de las neuronas motoras dentro de lo que se llama vector viral: usamos la envoltura de un virus, ponemos la versión del gen normal y luego se inyecta por perfusión en el bebé.

Por lo tanto, este gen se transcribirá y luego se traducirá y podrá fabricar de nuevo la proteína de supervivencia de la neurona motora. Esto ha sido muy eficaz en términos de supervivencia y adquisición de tono, caminar, etc. El fármaco acaba de ser autorizado en los Estados Unidos y comercializado, sin embargo, la inyección (única) tiene un coste de dos millones de dólares. Este es un ejemplo de terapia génica.

Pero ¿cuáles son los límites de la terapia génica?

Primero necesitamos una célula diana: por ejemplo, podemos pensar en las células bronquiales en la fibrosis quística con el desarrollo de estrategias terapéuticas en forma de aerosoles. Puede ser un poco más difícil de atacar las células renales con terapia génica, al ser células muy complejas. La enfermedad también debe estar vinculada a la ausencia o a la insuficiencia de la proteína. Es menos obvio si por ejemplo se tiene una enfermedad relacionada con una mutación que da una nueva propiedad a la proteína, como ya se mencionó, el gen del paciente continúa expresándose y la proteína que es dañina siempre estará presente; por lo tanto, introduciendo la proteína normal no necesariamente cambiarán las cosas.

Lo que fue una gran preocupación y lo sigue

siendo todavía es el riesgo de crear nuevas mutaciones en el genoma porque el ADN que se introduce puede añadirse en casi cualquier sitio. Os imagináis que, por ejemplo, si se inserta a nivel del promotor de un gen que es un represor de tumores, podemos luego promover la aparición de tumores. Hubo algunos ejemplos dramáticos después de las primeras pruebas con el desarrollo de leucemia o cáncer.

Para resumir el problema, hubo desarrollo de vectores que no encajaron en el genoma. Este fue el caso de la enfermedad de la que acabamos de hablar antes donde la pequeña versión del gen permaneció en el núcleo sin encajar en el genoma. No se introdujo ahí donde era necesario.

Y luego un problema que puede existir es la reacción del sistema inmunitario contra los vectores. Como se dijo anteriormente, los vectores son virus, pero ¿qué hace el cuerpo contra los virus? Se defiende. Se puede estar inmunizado contra adenovirus, un virus bastante común y destruir este virus antes de dar tiempo a que haga efecto la terapia génica.

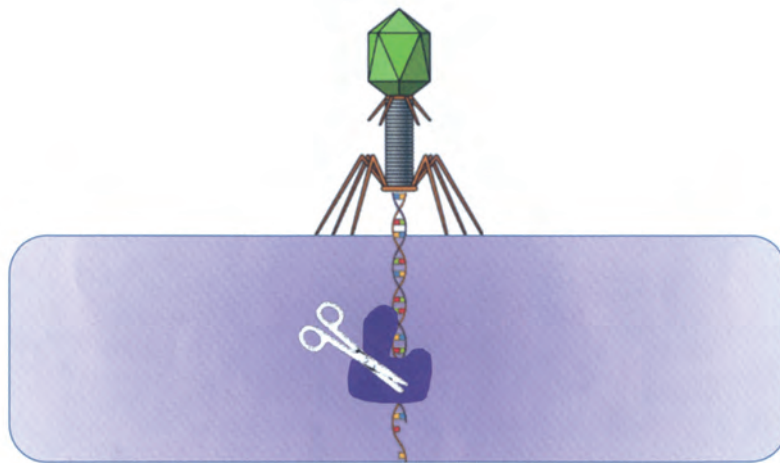
2.2. CRISPR Cas9

La CRISPR-Cas9 es una estrategia terapéutica que realmente ha hecho un gran revuelo mediático en los últimos años. Son las famosas tijeras de ADN. Con este método, en lugar de añadir una nueva versión del gen, iremos directamente a modificar la mutación que está presente.

¿Pero cómo funciona y de dónde viene?

CRISPR-Cas9 es un sistema que fue descubierto en bacterias. Las bacterias también pueden estar infectadas con virus. Tienen sus propios sistemas de defensa contra infecciones virales. En la imagen se muestra un virus grande llamado bacteriófago y en color morado una bacteria. El

CRISPR-Cas9



¡Descubrimiento del sistema CRISPR- Cas9 en ... 2007!
 Sistema de defensa de bacterias contra los virus.
 La bacteria reconoce el ADN viral y lo corta para neutralizarlo.

bacteriófago libera su ADN en las bacterias y en ese momento las bacterias activan un sistema de resistencia a esta invasión que es el sistema CRISPR-Cas9. Por tanto, este sistema es una respuesta de la bacteria a la invasión por el ADN viral.

Un sistema se activa y corta este ADN viral para neutralizarlo. Esto fue descrito por Philippe Horvath en 2007 en la industria de fermentos lácticos, pero no estaba a la altura de aplicaciones médicas. Hablamos mucho más de la descripción reciente de Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier en la aplicación médica.

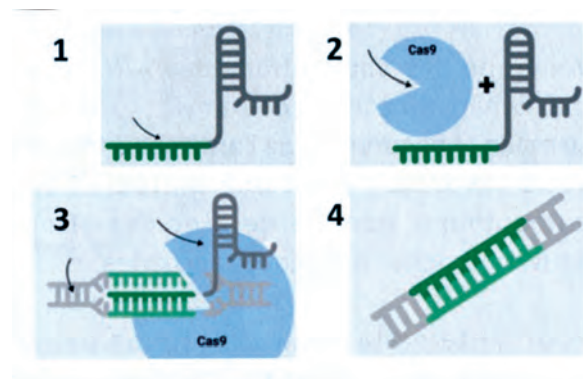
Este descubrimiento y sus posibles aplicaciones en el campo de la medicina ganó el Premio Nobel de Química en el 2020 con la estadounidense Jennifer Doudna y la francesa Emmanuelle Charpentier. Habían identificado este sistema en 2012.

El sistema es relativamente simple: necesita una "tijera genética", una proteína llamada proteína Cas9 y se requiere una guía para saber dónde cortar. He aquí nuestra guía: un pequeño ARN que tiene una secuencia complementaria a la del gen diana. Por perfecta complementariedad, se colocará exactamente en el lugar correcto. La tijera cortará exactamente donde se quiera cortar. Y después del corte, se creará una reparación.

CRISPR-Cas9

¿Qué hace falta?

- unas tijeras: la proteína Cas9
- una guía para saber dónde cortar: el ARN guía.



Esta reparación, puede ser realizada por la propia célula de manera que puede haber una nueva mutación por la exclusión de tal vez 1 o 2 nucleótidos (G.A.T.C.), o bien, podemos darle un modelo a la célula, diciéndole: “me gustaría que pusieras esto en su lugar” es decir la secuencia correcta. Así seremos capaces de corregir completamente la secuencia.

Hasta la fecha no existe una aplicación directa de la técnica CRISPR-Cas9 en humanos. Un caso llegó a los titulares en los últimos años. Se usó este sistema completamente desregulado, sin autorización y sin la correcta recogida de consentimiento. Lo que pasó es que un investigador chino, Sr. He Jiankui, utilizó el sistema CRISPRCas9 para inactivar un gen en etapa embrionaria para hacerlo resistente al VIH. Se trataba de una pareja en la que el padre, que era seropositivo con VIH, había recurrido a la fecundación in vitro. Este investigador decidió crear una mutación en el genoma de los niños antes de nacer, lo que los haría resistentes al VIH. Modificó un gen, el gen CCR5, que es un poco la puerta de entrada del virus al linfocito T. Activó este gen realmente en la etapa muy temprana de la formación del embrión y reimplantó los embriones. Las niñas se llaman Lulu y Nana.

Hay problemas éticos realmente serios, ya que esta mutación no era necesaria, no hay riesgo particular de infección para los gemelos por el VIH. Es algo que está además absolutamente fuera del marco legislativo y que no da lugar a autorización alguna. El problema también es que existe riesgo de susceptibilidad a otras infecciones a priori vinculado a estas mutaciones. Existe el riesgo de susceptibilidad a la gripe u otros virus.

Incluso ha habido estudios que han demostrado posteriormente, a nivel poblacional, que

se trataba de variantes que estaban quizá asociadas a una expectativa de supervivencia más corta. Por último, siempre existe un riesgo distinto a cero, el famoso efecto “fuera del objetivo”, es decir, el riesgo de introducir una mutación en otra parte del genoma con un posible y desconocido efecto perjudicial. Por supuesto esto sensibilizó a la comunidad científica internacional sobre el riesgo real de una tecnología usada de un modo irracional y la importancia de legalizar las cosas. Existía ya un marco legal, pero, por supuesto, debe ser validado para todos los países.

¿Cuáles pueden ser los usos?

Por el momento todavía no estamos usando el sistema CRISPR-Cas9 en terapia, sin embargo, es de primordial importancia en el campo de la investigación dado que es mucho más fácil de crear modelos celulares o modelos animales para entender las enfermedades. Por ejemplo, si identificamos un nuevo gen en una enfermedad y si queremos saber exactamente lo que sucede, crearemos un modelo animal, por ejemplo, un modelo ratón, inactivamos este gen y observamos lo que ocurre. Realmente es un vector de progreso en la comprensión de la enfermedad, lo que es muy importante.

En segundo lugar, también ayuda a crear siempre modelos celulares o animales para evaluar una nueva vía terapéutica: por ejemplo, se tiene la impresión de que un nuevo medicamento que actuaría sobre una vía metabólica quizás sería interesante. Entonces, antes de desarrollar el medicamento, miraremos en células o en ratones lo que sucede cuando inactivamos el gen que codifica esta proteína diana. Por consiguiente, es también un vector de aceleración de desarrollo.

Hay otras ideas de uso, por ejemplo, se ha hablado sobre la erradicación de la malaria; si hacemos que los mosquitos sean resistentes a la malaria, tal vez podríamos erradicarla. Hay aplicaciones en la industria alimentaria y por supuesto todo esto plantea de nuevo importantes cuestiones éticas.


2.3. Los ARN interferentes

Es un ARN (ácido ribonucleico) que interferirá con el ARN mensajero para degradarlo y por consiguiente disminuir la traducción de la proteína. Anteriormente habíamos hablado de terapia génica, es decir, añadir un gen o ir a repararlo. En este caso actuamos un poco antes, es decir, en el ARN mensajero, o en el ARN pre-mensajero, o en el ARN mensajero en el citosol y este ARN interferente lo neutralizará, cortará antes de que dé lugar a una proteína.


Lo que los hace específicos es que son pequeñas secuencias completamente compatibles una vez más con la secuencia diana. Este ARN interferente se posicionará al nivel del ARN mensajero al que se apunta, permitiendo su ruptura y su destrucción y por lo tanto la ausencia de síntesis de proteínas maduras.

Esta es una de las aplicaciones de los ARN interferentes. Ahora con el caso de amiloidosis hereditaria y especialmente amiloidosis por transtiretina sabemos que es una enfermedad hereditaria autosómica dominante con trastornos que pueden afectar a muchos órganos. En esta enfermedad, los ataques pueden ser neurológicos y cardíacos. Hay dos tratamientos con ARN interferentes recientemente comercializados: PATISIRAN e INOTERSEN. Se trata de pequeñas secuencias de ARN que se fijarán en la secuencia de ARN mensajero que codifica la transtiretina, causando su escisión antes de que dé lugar a una proteína.

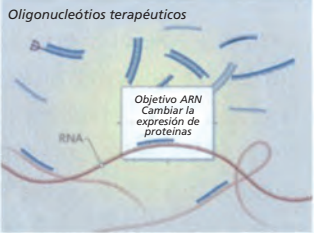
ARN interferentes



Andrew Fire y Greg Mello.
Premio Nobel de fisiología y medicina 2006



BLOQUEO PREVIO A LA TRADUCCIÓN DE LA PROTEÍNA MUTADA



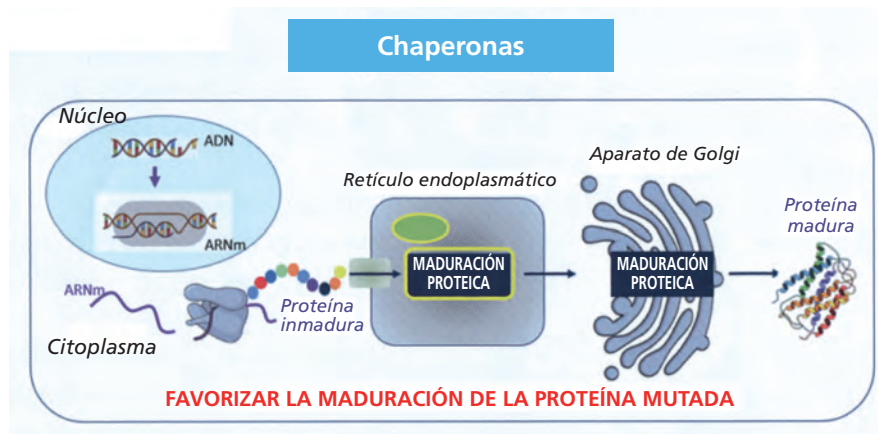
Oligonucleótidos terapéuticos

Objetivo ARN
Cambiar la expresión de proteínas

Un **ARN interferente** es un [ácido ribonucleico](#) (ARN) cuya interferencia con un [ARN mensajero](#) específico conduce a su degradación y a la disminución de su traducción en proteína.

Otro término empleado: oligonucleótido antisentido.

Complementariedad entre la secuencia de ARNi y el ARNm diana.



- ✓ Ejemplo: fibrosis quística (tezacaftor - lumacaftor), enfermedad de Fabry (migalstat)
- ✓ Dependiente de la mutación: algunas mutaciones son accesibles, pero no todas
- ✓ Dependiente de la enfermedad. Utilizable en teoría si:
 - un aumento de la proteína “madura” puede mejorar la enfermedad
 - o si un aumento en la proteína “madura” puede disminuir el efecto tóxico de la proteína mutada

Estas pruebas que llevaron al desarrollo de estos medicamentos y su comercialización han mostrado beneficios en términos de calidad de vida y en cuanto a la gravedad de la afectación neurológica.

¿Cuáles son los posibles efectos secundarios de estos medicamentos? A veces esto puede llevar a reacciones inflamatorias. El segundo medicamento a veces se asocia con una disminución en la tasa de plaquetas o daño renal en el 3% de pacientes.

Hay otros ensayos con ARN interferentes de nefrología en estudio, especialmente para hiperxaluria primaria.

Otro ejemplo de una aplicación es el síndrome de Alport. Esto es un poco diferente. La diana, no es directamente el ARN del gen involucrado en la enfermedad. De hecho, sabemos que, en ciertas enfermedades genéticas, hay un proceso en cascada que da como resultado una serie de activaciones en las vías celulares que son perjudiciales para la progresión de la enfermedad. Estas activaciones están controladas por lo que

llamamos micro ARN, que pueden ser dirigidos con ARN interferentes.

Se otorgó un Premio Nobel a Andrew Fire y Craig Mello en 2006 por su identificación y descripción de los ARN interferentes.

2.4. Otras estrategias terapéuticas: Las chaperonas

Finalmente, tenemos el último aspecto de estas terapias génicas: las chaperonas.

Como anteriormente dijimos, para obtener una proteína funcional debemos tener una versión no mutada de un gen, bien traducido, bien transcrito y que madura adecuadamente. Por lo tanto, también podemos posiblemente intervenir en la maduración de una proteína, es decir, que podemos tener en algunas patologías una proteína que no es del todo normal, pero si la ayudamos a madurar, todavía hará un poco mejor su trabajo o al menos recuperará un poco más de su función.

Podemos promover la maduración de una proteína que sería un poco diferente de la pro-

teína no mutada. Esos tratamientos se llaman chaperonas.

¿Qué hacen esas chaperonas? Se llevan la proteína inmadura (el collar) y lo ayudan a llegar a donde debe ir, tal vez con una o dos perlas o cuencas diferentes. Finalmente, si favorecemos su plegado, si la ayudamos en sus diferentes etapas de maduración, tal vez sea capaz de asegurar al menos parte de su función y podremos mejorar los síntomas. Este es el caso en particular en la fibrosis quística con el desarrollo de dos tratamientos (tezacaftor - lumacaftor) en algunas mutaciones, aunque no para todas, permite promover la maduración de las proteínas y restaurar un poco de sus funciones. También hay un tratamiento desarrollado para la enfermedad de Fabry llamada migalastat.

Una vez más tendremos que saber para qué mutaciones en particular se puede esperar tener un efecto beneficioso, no es el caso de todas las mutaciones.

En un tratamiento que depende del tipo de mutación, algunas mutaciones son accesibles al tratamiento, pero no todas. Podemos imaginar que, por ejemplo, si tenemos una mutación que da lugar a una ausencia de proteína, por más que la ayudemos a madurar eso no cambiará mucho las cosas. Pero si, por ejemplo, tenemos una secuencia un poquito diferente, tal vez esto le ayude a madurar y le permita mejorar sus funciones.

También dependiendo de la enfermedad, podemos utilizar este tratamiento si se cree que el

aumento de la proteína madura puede aportar mejoras, o si se cree que las proteínas inmaduras estorban y son tóxicas para la célula. De esta manera, si se les ayuda a madurar y salir de la célula puede disminuir el efecto tóxico de la proteína mutada y mejorar las cosas.

3. Conclusión

En resumen, lo que quería explicar es que existen varias estrategias que conviven actualmente y que el manejo y tratamiento médico de una enfermedad seguramente pasará por una combinación o algoritmo de elección entre estas estrategias. Se tiene ya el ejemplo con la fibrosis quística porque sabemos que se usan diferentes medicamentos dependiendo del tipo de mutaciones presentes en el paciente.

Realmente hay una aceleración en el desarrollo de estrategias de terapia génica. Por ejemplo, vemos el descubrimiento del sistema CRISPRCas9 en 2012 y todo lo que ha sucedido desde entonces.

También vemos todo el progreso en la terapia génica que hubo recientemente.

Vemos que puede haber tratamientos personalizados, es decir, el desarrollo de estrategias terapéuticas para un solo paciente, con ejemplos reportados en la literatura científica recientemente.

Esto planteará importantes cuestiones éticas, seguro, pero creo que sigue siendo ante todo portador de esperanza.