



# FUNDAMENTOS DE BIOTECNOLOGÍA MÉDICA Y GENÉTICA MOLECULAR

Asignatura: BIO-INFORMÁTICA

Profesor: Miguel Ángel Fernández Graciani

Realizado por:

Luís Miguel Bastante Quijano

Salvador Gonzalez Lopez

# INDICE

## 0.- PRÓLOGO

## 1.- INTRODUCCIÓN

## 2.- PARTE PRIMERA: CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS. INGENIERÍA TISULAR

- 2.1. Fundamentos del cultivo de células y tejidos: parámetros y medios técnicos
- 2.2. Tipos de cultivos
- 2.3. Aplicaciones del cultivo de células:
  - Obtención de anticuerpos monoclonales
  - Obtención de fármacos mediante cultivo *in vitro*.
- 2.4. Ingeniería tisular: órganos artificiales
  - Las células
  - La matriz polimérica o andamio
  - Algunos ejemplos de tejidos y órganos biosintéticos
- 2.5. Células totipotentes
- 2.6. Transplante de células

## 3.- PARTE SEGUNDA: TERAPIAS GÉNICAS

- 3.1. Estrategias para la terapia génica.
- 3.2. Tecnología de la terapia génica:
  - Vectores de transferencia génica.
- 3.3. Terapia génica basada en la inhibición génica.
- 3.4. Terapia génica para enfermedades hereditarias.
- 3.5. Terapia génica contra el cáncer.
- 3.6. Terapia génica para enfermedades infecciosas.

## 4.- PARTE TERCERA: TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE.

- 4.1. Clonación acelular y clonación celular.
- 4.2. Vectores de clonación.
- 4.3. Construcción de moléculas de ADN recombinante. Clonación de genes.
- 4.4. Concepto y construcción de genotecas.
- 4.5. Manipulación genética de microorganismos.
- 4.6. Manipulación genética de células y organismos animales:

- Manipulación de células animales
- Manipulación de organismos animales
  - microinyección de pronúcleos
  - inyección de blastocitos de células madre genéticamente modificadas
  - obtención de animales clónicos

4.7. Agentes terapéuticos y vacunas:

- Clonación por expresión de productos génicos normales
- Anticuerpos manipulados por ingeniería genética
- Vacunas obtenidas por ingeniería genética

## 5.- CONCLUSIONES

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

## 0.- PRÓLOGO

Rápidos avances y numerosos éxitos han abierto nuevas puertas en el campo de la medicina, permitiendo llegar hasta límites insospechados. Mientras que los medicamentos producidos por ingeniería genética, como por ejemplo la insulina, son muy comunes, las terapias génicas aún no han tenido el éxito deseado. Pero es indiscutible que la ingeniería genética supondrá una revolución en la medicina del siglo XXI. Nuevas estrategias contra enfermedades actualmente incurables están siendo objeto de una investigación intensiva.

La ingeniería genética es la tecnología o más concretamente la biotecnología de la manipulación y transferencia de ADN de un organismo a otro, que posibilita la creación de nuevas especies, la corrección de defectos genéticos y la fabricación de numerosos compuestos.

En 1973 los investigadores Stanley Cohen y Herbert Boyer producen el primer organismo recombinando partes de su ADN en lo que se considera el comienzo de la ingeniería genética. En 1997 se clona el primer mamífero, la Oveja Dolly.

Actualmente la Ingeniería Genética está trabajando en la creación de técnicas que permitan solucionar problemas frecuentes de la humanidad como, por ejemplo, la escasez de donantes para la urgencia de trasplantes. En este campo se están intentando realizar cerdos transgénicos que posean órganos compatibles con los del hombre.

El ADN es una base fundamental de información que poseen todos los organismos vivos, hasta el más simple y pequeño. Esta información está a su vez dividida en determinada cantidad espacios llamado loci(plural) locus (singular); que es donde se encuentra insertado los genes, que varían dependiendo de la especie. A su vez, cada gen contiene la información necesaria para que la célula sintetice una proteína, por lo que el genoma y, en consecuencia, el proteoma, van a ser los responsables de las características del individuo.

Los genes controlan todos los aspectos de la vida de cada organismo, incluyendo metabolismo, forma, desarrollo y reproducción. Por ejemplo, una proteína X hará que en el individuo se manifieste el rasgo de "pelo oscuro", mientras que la proteína Y determinará el rasgo de "pelo claro".

Vemos entonces que la carga genética de un determinado organismo no puede ser idéntica a la de otro, aunque se trate de la misma especie. Sin embargo, debe ser en rasgos generales similar para que la reproducción se pueda concretar, ya que una de las propiedades más importantes del ADN, y

por la cual se ha dicho que fue posible la evolución, es la de dividirse y fusionarse con el ADN de otro individuo de la misma especie para lograr descendencia diversificada.

Otra particularidad de esta molécula es su universalidad. A raíz del concepto de gen, surgen algunas incógnitas: ¿Son compatibles las cargas genéticas de especies distintas? ¿Puede el gen de una especie funcionar y manifestarse en otra completamente distinta? ¿Se puede aislar y manipular el ADN? La respuesta a todas estas preguntas se resume en dos palabras: Ingeniería Genética.

# 1.- INTRODUCCIÓN

La presente memoria tiene por objetivo cumplimentar el apartado práctico de la asignatura Bio-Informática.

Hemos comenzado la memoria con un prólogo, donde a modo resumen, hemos recalcado algunos aspectos históricos y otros no tanto, que conciernan a lo que expondremos a continuación.

En la primera parte de la práctica hablaremos de dos aspectos: el cultivo de células y tejidos, y la ingeniería tisular. En esta parte tendremos como objetivos: explicar el concepto de cultivo de tejidos y sus tipos principales; describir los principales parámetros de los que depende el cultivo de tejidos; describir el procedimiento básico para subcultivar una línea celular; explicar los procedimientos de obtención de fármacos y de anticuerpos monoclonales mediante cultivo *in vitro* y su utilidad; describir las técnicas y principios en los que se basa la ingeniería de tejidos y la obtención de órganos artificiales; explicar algunos ejemplos de órganos artificiales de uso actual en clínica; explicar la utilidad del trasplante de células; definir el concepto de material biocompatible y explicar sus principales aplicaciones, citando algunos ejemplos; explicar el concepto de célula pluripotente, los factores que controlan el proceso de diferenciación celular y la utilidad clínica de este tipo de células, indicando algunas estrategias empleadas para evitar el rechazo inmunológico.

En la segunda parte, hablaremos de terapias génicas donde intentaremos definir el concepto de terapia génica y analizar los principios en los que se basan sus distintas estrategias; describir las características fundamentales de los principales vectores utilizados en la terapia génica; explicar el fundamento molecular de la terapia génica aplicada a enfermedades hereditarias y los principales requisitos para que su abordaje sea efectivo; describir las estrategias terapéuticas utilizadas en la terapia génica de enfermedades neoplásicas e infecciosas.

En la última parte (tercera), concluiremos la memoria hablando de la tecnología recombinante del ADN donde por objetivos tendremos los siguientes: explicar el concepto de clon, así como los tipos de clonación molecular; explicar las características generales de los distintos tipos de vectores de clonación que se usan para manipular genéticamente bacterias, levaduras y células animales; describir los pasos generales para obtener genotecas de ADNc y genómicas; explicar la utilidad de las genotecas; explicar los métodos de introducción de moléculas de ADN en células procariontas y eucariontas; describir las manipulaciones genéticas que permiten la expresión de proteínas recombinantes en microorganismos y células eucariontas, indicando los principales elementos que componen los vectores

de expresión utilizados; definir el concepto de fármaco recombinante e indicar las ventajas que presentan estos compuestos en la terapia humana; citar algunos ejemplos de fármacos recombinantes producidos en organismos procariontes y eucariotes; definir el concepto de animal transgénico, knock-out y clónico; describir las manipulaciones genéticas que permiten la expresión de proteínas exógenas en animales transgénicos y clónicos, indicando las ventajas que ofrecen estos sistemas de expresión; explicar las estrategias que han permitido el desarrollo de vacunas genéticas y de anticuerpos modificados genéticamente y los beneficios que ofrecen estas nuevas estrategias terapéuticas.

Finalmente, haremos unas conclusiones sobre el aporte de todo lo anterior. Es necesario decir que la memoria ha sido fruto de un trabajo de recopilación de información y documentación, de diversas fuentes. Todas ellas se recopilan en la bibliografía.

## 2.- PARTE PRIMERA: CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS. INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación reciente con una gran proyección en la medicina moderna. El desarrollo de tejidos, e incluso órganos, que puedan sustituir a tejidos u órganos enfermos no es ciencia ficción, ya se ha comercializado un tipo de piel artificial sintetizada por el hombre.

También recientemente se han aislado y cultivado por primera vez **células madre embrionarias pluripotentes humanas** capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, lo que abre una puerta al desarrollo de tejidos y órganos humanos.

Aunque el desarrollo de la ingeniería de tejidos es un área muy reciente con no más de diez años de vida, el inicio de las técnicas de cultivo de células y tejidos, que constituyen la base de esta nueva tecnología, data de comienzos del siglo XX. Los primeros cultivos se realizaron con fragmentos de tejidos que se mantenían vivos *in vitro* durante un corto periodo de tiempo; posteriormente, en la década de los 50, se comenzó a obtener cultivos de células aisladas a partir de tejidos disgregados por métodos mecánicos o químicos.

### 2.1. Fundamentos del cultivo de células: parámetros y medios técnicos

El cultivo de células ha sido esencial para el estudio de múltiples aspectos del comportamiento celular fuera de las influencias y variaciones sistémicas de los organismos animales. A parte del papel fundamental que el cultivo de células y tejidos tiene en el avance del conocimiento de la biología celular y molecular, su dominio es fundamental en la biotecnología médica como se comentaba al inicio. El cultivo de células no sólo promete grandes resultados en la ingeniería de tejidos, sino que actualmente es un método eficaz para la obtención de productos con gran interés terapéutico, como los anticuerpos monoclonales, las vacunas virales o ciertos fármacos antitumorales como el taxol.

Las principales ventajas que ofrece el cultivo de tejidos son:

- El control del medio en el que se encuentran las células, tanto el medio físico-químico (pH, temperatura, presión parcial de oxígeno...) como fisiológico (presencia de suero, hormonas, factores de crecimiento...).
- Caracterización y homogeneidad de las células. En los tejidos se encuentran varios tipos celulares, estos se pueden aislar y cultivar independientemente.

- Gran expansión del número de células. Resulta útil cuando se trata de obtener algún producto con interés farmacológico.
- Cuando se trata de analizar el efecto de diferentes sustancias en un proceso celular, el cultivo permite una interacción directa del producto y la célula.

Existen también limitaciones y desventajas en esta técnica.

- Es necesario trabajar en unas condiciones que garanticen una gran esterilidad para evitar la contaminación con bacterias, hongos y levaduras de crecimiento mucho más rápido que las células. El manejo se realiza en cámaras de flujo laminar, dispositivos que garantizan un ambiente estéril. De igual forma todos los elementos en contacto con las células o tejidos deben ser estériles (recipientes, medios de cultivo...).
- En algunos casos es difícil conseguir la cantidad mínima de material que permita el desarrollo de un cultivo.
- En ocasiones las células tienden a la desdiferenciación y pérdida de su fenotipo característico.
- Se pierde la estructura tridimensional de los tejidos y las interacciones entre los distintos tipos de células, lo que puede modificar el comportamiento de éstas.

## **Parámetros y medios técnicos del cultivo de tejidos**

Las células en cultivo requieren un ambiente adecuado que les permita su mantenimiento y en algunos casos la proliferación. Este ambiente incluye:

- **Un recipiente**, en el que puedan crecer las células en un ambiente estéril para evitar la contaminación con microorganismos. En la mayoría de los casos las células de tejidos sólidos necesitan adherirse para crecer, y lo hacen en una monocapa; sólo las células de origen hematopoyético y algunas células tumorales crecen en suspensión. Estos recipientes, estériles, con forma de cajas o botellas planas, suelen estar formados por materiales plásticos como poliestirenos que son transparentes y presentan buenas cualidades ópticas para observar las células al microscopio. Los recipientes más comunes son:

- **placas de Petri** (ventiladas). Disponibles en 3 tamaños : 3.5, 6.0 y 10 cm de diámetro son las más empleadas cuando se trata de crecer las células para usar directamente en experimentos. No es recomendable, por su escasa estanqueidad, emplearlas para el mantenimiento de líneas.

- **multiplacas**. Es una variante de las placas de Petri. Placas de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos.

- **frascos de Roux** (botellas ventiladas o no). Disponibles en

diferentes tamaños, son recomendables para el mantenimiento de las líneas y la producción de células, o bien para el crecimiento de células en suspensión.

Además del tipo de recipiente es importante considerar la eficacia de plaqueo de cada uno de éstos.

La adhesión de las células se lleva a cabo a través de receptores de superficie que reconocen ciertas moléculas de la matriz extracelular, esto implica que la unión de las células a los recipientes de cultivo debe ir precedida por la secreción de proteínas de la matriz extracelular y proteoglicanos. Para favorecer la adhesión se puede añadir a las placas o botellas de cultivo proteínas típicas de la matriz extracelular, que son comerciales y que facilitan la adhesión, y por lo tanto la actividad normal de las células en el cultivo.

El tapón de la botella no se cierra herméticamente, para facilitar la difusión de los gases.



**Botella para el cultivo de células.** Obsérvese el color rojo del medio de cultivo, debido al indicador de pH.

**-Una fase gaseosa** que aporta unos niveles de O<sub>2</sub> adecuados que varían dependiendo de los tejidos, aunque en general son próximos a la proporción que presenta el aire. Esta fase gaseosa también aporta CO<sub>2</sub> (habitualmente a una concentración del 5%) que tiene un importante papel en el mantenimiento del pH del medio.

**-Un medio de cultivo** que suministre los nutrientes y factores básicos que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de las células, y que imita al medio que rodea a las células en el organismo. Este medio contiene:

**-Sales inorgánicas** que proporcionan Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y CO<sub>3</sub>H que garantizan una osmolaridad adecuada y son esenciales para el mantenimiento de los potenciales de membrana. El mantenimiento constante del pH del medio de cultivo en un valor fisiológico (7,4), es fundamental para asegurar la supervivencia de las células. El sistema tampón que se emplea es el ácido carbónico/bicarbonato, el principal tampón fisiológico extracelular. El CO<sub>2</sub> de la atmósfera del incubador se disuelve en el medio acuoso del cultivo, combinándose con el agua para formar ácido carbónico, el cual forma un equilibrio químico con el bicarbonato

sódico del medio. Además, el medio de cultivo contiene un indicador de pH que cambia de color cuando el pH se aleja del valor fisiológico. La presencia de este indicador hace que el medio de cultivo tenga color rojo.

- **Glucosa** como sustrato energético.
- **Aminoácidos** que incluyen sobre todos los esenciales aunque los medios suelen contener todos.
- **Vitaminas**.
- **Suplementos orgánicos** que incluyen nucleósidos, peptidos, lípidos y otros componentes.
- **Hormonas o factores de crecimiento**, esenciales para el crecimiento y actividad celular.

Un gran número de células necesita una cierta proporción de **suero fetal** o neonatal en el medio de cultivo. Este suero normalmente se obtiene de vacas o caballos. El suero tiene una gran cantidad de componentes esenciales para el crecimiento y la viabilidad celular:

- **Factores de adhesión** como fibronectina.
- **Péptidos** que regulan el crecimiento y la diferenciación celular (insulina, factor de crecimiento de las plaquetas...).
- **Nutrientes esenciales** como minerales, vitaminas, ácidos grasos, intermediarios metabólicos...
- **Hormonas**, como insulina, hormonas tiroideas y esteroideas, estrógenos...
- **Inhibidores de proteasas, y proteínas de transporte**, como albúmina.

Conforme se van diseccionando los diferentes componentes del suero se tiende a añadir en los cultivos únicamente los elementos básicos necesarios para poder controlar mejor la composición del medio y la reproducibilidad de éste.

**-Una temperatura y humedad constante.** Las células se mantienen a una temperatura similar a la temperatura del organismo de origen, en general 36,5-37°C. Los cultivos celulares se mantienen en incubadores que garantizan la temperatura adecuada y un cierto grado de humedad. Estos incubadores contienen también una fase gaseosa adecuada como se describió anteriormente. Además, la atmósfera en el interior del incubador está saturada de vapor de agua, lo que contribuye a minimizar la evaporación del medio de cultivo.

Ello se consigue poniendo una bandeja con agua destilada estéril en el incubador.



**Incubadores para el cultivo de células *in vitro*.** Obsérvese en la imagen de la izquierda la conexión a dos balas de CO<sub>2</sub>, necesarias para mantener una atmosfera con un 5% de este gas, esencial para el mantenimiento del pH del medio de cultivo. La imagen de la derecha muestra uno de los incubadores abierto.

**-Esterilidad.** Todos los componentes del cultivo han de estar estériles. Para mantener la esterilidad se trabaja en un ambiente carentes de gérmenes, partículas en suspensión, etc., proporcionado por las campanas de flujo laminar. Como su nombre indica, estos aparatos crean un flujo laminar de aire estéril que impide la contaminación del cultivo por microorganismos. Se suele además trabajar en la proximidad de la llama de un mechero, y se utilizan guantes y mascarillas para evitar contaminaciones.

**Campana de flujo laminar para el cultivo de células.** El aire es



esterilizado mediante un filtro que retiene los microorganismos y es impulsado desde la parte posterior a la anterior creando un flujo laminar.

**-Microscopio invertido.** Para la visualización directa de las células en cultivo se emplean microscopios invertidos. Estos aparatos tienen una elevada profundidad de campo y además poseen el objetivo situado por debajo de la muestra, lo que permite observar las células cuando se condensa vapor de agua en la parte superior de la botella de cultivo, algo habitual cuando ésta se coloca a temperatura ambiente.



**Microscopio invertido.** Obsérvese la localización de los objetivos por debajo de la muestra.

## 2.2. Tipos de cultivos

En general se pueden realizar tres tipos de cultivos de tejidos:

I. **Cultivos de órganos.** Se mantiene la arquitectura original del tejido en un medio líquido, o semisólido, que favorece el mantenimiento de la diferenciación celular.

II. **Cultivos de explantes primarios.** Constituidos por pequeños fragmentos de tejidos, a partir de los cuales pueden migrar las células de los extremos por proliferación.

III. **Cultivos de células (ver siguiente figura).** Formados por células libres obtenidas mediante dispersión mecánica o química (por acción de enzimas como las colagenasas que degradan la matriz extracelular que mantiene unidas las células en el tejido) de los tejidos. Los cultivos de estas células reciben el nombre de **cultivos primarios**. En general, estos cultivos tienen una duración limitada ya que las células se dividen un número determinado de veces y además van desdiferenciándose con el tiempo. Ello se debe a que las células somáticas adultas no expresan la enzima telomerasa, por lo que después de cada división celular se acorta la longitud de los telómeros. Superado un número determinado de divisiones puede comenzar a perderse regiones codificantes, lo que determina la inviabilidad de la célula.

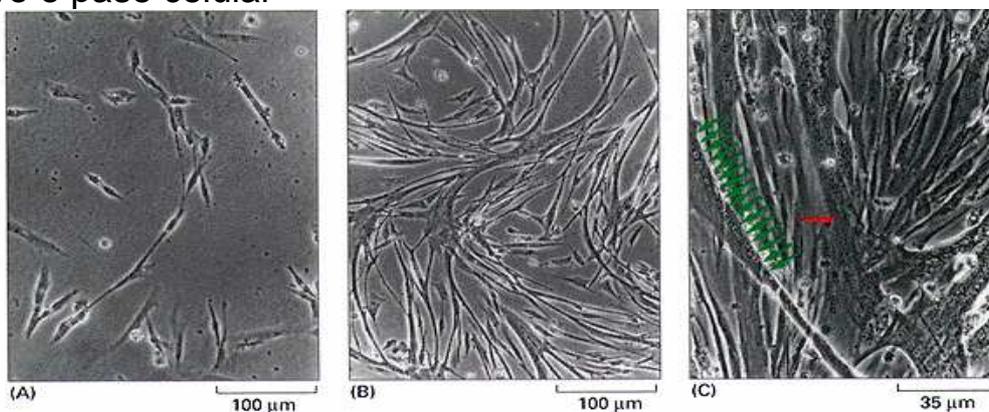
El número de tipos celulares diferentes que pueden ser actualmente cultivado es muy elevado, e incluye células de los tejidos conectivos, como

fibroblastos, células del tejido óseo o cartilaginoso, músculo esquelético, cardíaco o liso, células de origen epitelial (hígado, pulmón, riñón, piel), células neuronales (glía y neuronas), células del sistema endocrino (adrenales, pituitaria, pancreáticas) y un gran número de células tumorales.

Una **línea celular** está constituida por una población de células que deriva de una misma célula, por lo tanto todas ellas son idénticas, tienen carácter clonal. Además tienen una capacidad de proliferación continua debido a que se ha producido una “**transformación**” de su fenotipo original, por lo que en ocasiones el comportamiento biológico se aparta del característico de las células originales de partida. Estas células son muy útiles en investigación porque ofrecen un sistema de trabajo homogéneo y continuo.

La proliferación continua de las células en los recipientes de cultivo produce una ocupación total de la superficie de cultivo, lo que obliga con el paso del tiempo a realizar un subcultivo o **pase**. Para ello, si las células crecen adheridas a la superficie, se desprenden mediante tratamiento con enzimas (tripsina por ejemplo), se recogen las células desprendidas, se diluyen, y una pequeña cantidad de las mismas se vuelven a poner en medio adecuado para que sigan creciendo. Hablamos entonces de líneas celulares que se pueden mantener en cultivo durante periodos muy largos, y están constituidas por células transformadas que han sufrido algún cambio en su fenotipo que aumenta su capacidad de proliferación. Las células tumorales entran dentro de esta categoría.

**Evolución de un cultivo de células de tipo fibroblástico a lo largo del tiempo.** Este es un ejemplo típico de células de crecimiento rápido. La proliferación de las células adheridas a un recipiente de cultivo aumenta la densidad de éstas, que terminan por tapizar toda la placa formando una monocapa. Para que las células puedan seguir creciendo es necesario despegarlas de los recipientes, diluirlas con más medio de cultivo y sembrarlas de nuevo con menor densidad. Este proceso se denomina subcultivo o pase celular



## 2.3. Aplicaciones del cultivo celular

El cultivo de células y tejidos ha dejado de ser una técnica exclusivamente experimental y de aplicación tan solo en investigación, para convertirse en la base de la producción de determinados agentes terapéuticos como proteínas humanas, células y tejidos para el trasplante (piel por ejemplo). Es posible que en un futuro no muy lejano se pueda incluso obtener órganos *in vitro*. Veremos algunas de estas aplicaciones.

### 2.3.1. Obtención de fármacos mediante cultivo *in vitro*.

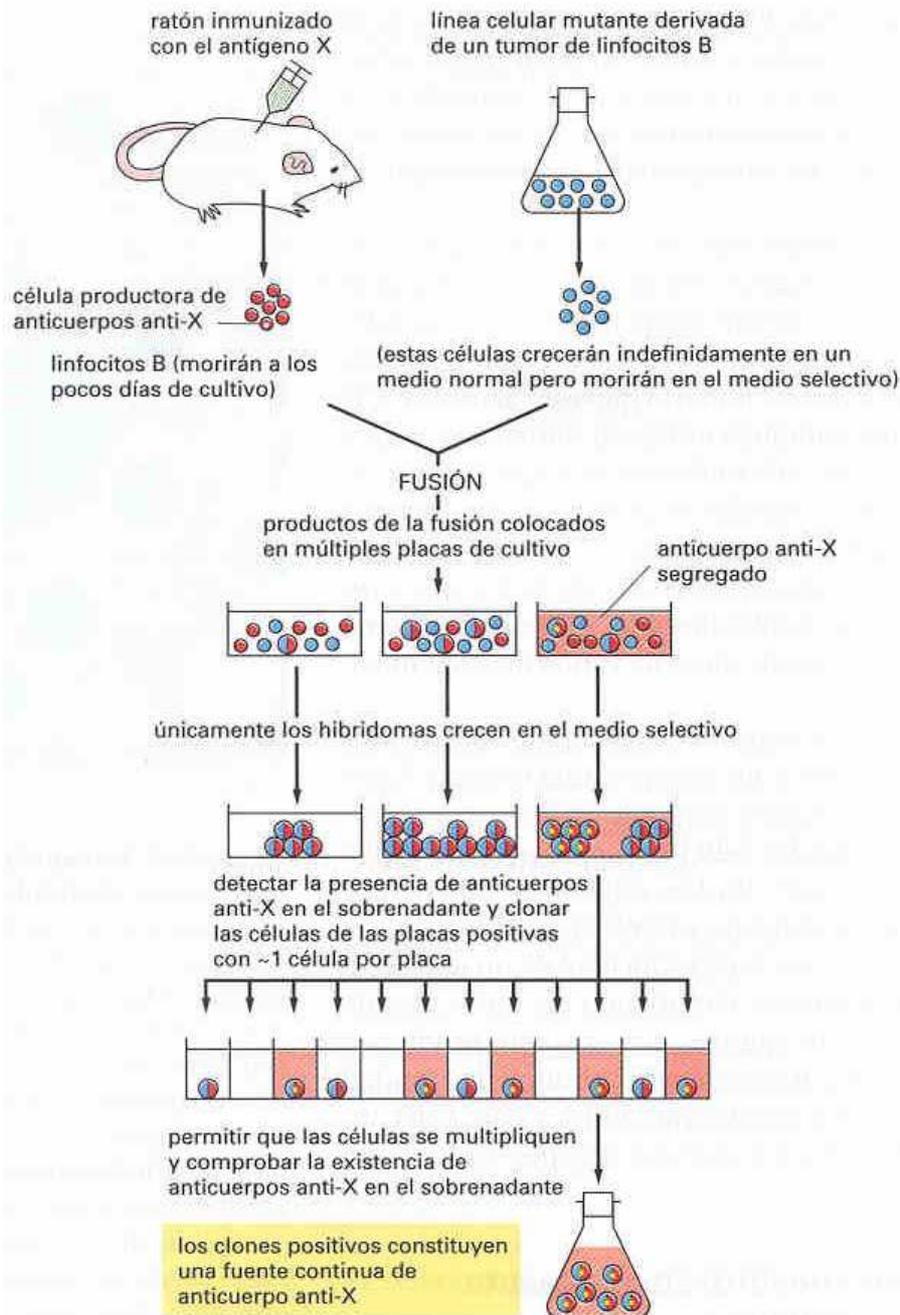
Una de las grandes ventajas de los cultivos celulares es la posibilidad de seleccionar un tipo celular y amplificarlo estimulando su proliferación. Esta amplificación de células es de gran utilidad en el caso de que estas células sinteticen algún producto de interés farmacológico, ya que se pueden hacer cultivos a gran escala en bioreactores y aumentar fuertemente los rendimientos. Las células vegetales también pueden ser cultivadas. Aunque el estudio del cultivo de células vegetales excede los objetivos de esta asignatura, veremos un ejemplo de su empleo con fines terapéuticos. Se ha desarrollado el cultivo de células de la corteza del tejo canadiense para la producción del **taxol**, un importante fármaco antitumoral con una estructura química tan compleja que no permite su obtención directa por síntesis química. Este compuesto se aislaba y purificaba anteriormente de la corteza del tejo, lo que llevó a la tala masiva del árbol; sin embargo, una vez obtenidas las condiciones de cultivo de estas células vegetales, se asegura una producción homogénea y continua del compuesto.

### 2.3.2. Obtención de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son agentes terapéuticos naturales producidos por linfocitos B, capaces de reconocer específicamente sustancias extrañas que llegan a nuestro organismo. La unión de un anticuerpo puede bastar para neutralizar algunas toxinas y virus, pero lo más común es que el anticuerpo dispare el sistema del complemento y la inactivación mediada por células. La entrada de una sustancia extraña en el organismo origina la formación de una gran cantidad de anticuerpos por los linfocitos B que reconocen diferentes determinantes antigénicos de esa sustancia. En cada precursor de linfocito B tiene lugar una reordenación de componentes de los genes de anticuerpos específica de cada célula individual que va a originar un único anticuerpo. Como resultado se tiene que frente a una sustancia exógena cualquiera, cada individuo posee una población de linfocitos B que colectivamente asegura un gran repertorio de anticuerpos diferentes contra distintas zonas el antígeno foráneo. A estos anticuerpos se les denomina **anticuerpos policlonales**. Estos anticuerpos son obtenidos a partir de los antiseros. Éstos son útiles para numerosas aplicaciones biológicas, pero

presentan ciertas desventajas debidas a la heterogeneidad de los anticuerpos que contienen. Cada antisuero va a ser diferente de los demás, incluso si se genera en un animal genéticamente idéntico y utilizando la misma preparación de antígeno. Por otro lado, el antisuero sólo puede producirse en cantidades limitadas, lo cual hace que sea imposible utilizar el mismo lote de reactivo en una serie larga o extensa de experimentos o análisis clínicos. Para superar dichos problemas y dominar mejor las aplicaciones de los anticuerpos, fue necesario desarrollar una estrategia de producción de moléculas de anticuerpo en cantidades ilimitadas, que además presentaran estructura homogénea y la especificidad deseada. Ello se ha logrado mediante la producción de anticuerpos monoclonales, bien a partir de células híbridas de células secretoras de anticuerpos o bien, por ingeniería genética. El cultivo celular ha permitido desarrollar anticuerpos terapéuticos producidos artificialmente, que son monoespecíficos o **monoclonales** (es decir, que reconocen un único tipo de lugar antigénico), y pueden aplicarse específicamente al reconocimiento de ciertos antígenos asociados a enfermedades. El método habitual de producción de anticuerpos monoclonales data de 1976 y consiste en propagar en cultivo un clon de células a partir de un único linfocito B secretor de un único anticuerpo que reconoce un determinante antigénico específico. El problema práctico es que los linfocitos B tienen una vida muy limitada en cultivo. Para solucionar esta limitación, se fusionaron linfocitos B individuales de un ratón previamente inmunizado y células inmortales derivadas de un tumor de linfocitos B de ratón (células de mieloma) (ver la Fig. 2). Del resultado de la fusión, se obtiene una mezcla heterogénea de células híbridas, de esta mezcla se seleccionan las que son capaces de producir un anticuerpo en particular al tiempo que mantienen la propiedad de ser inmortales en cultivo. Estos **hibridomas** se propagan como clones individuales, cada uno de los cuales puede proporcionar una fuente permanente y estable de un único tipo de anticuerpo monoclonal que reconocerá un único tipo de determinante antigénico.

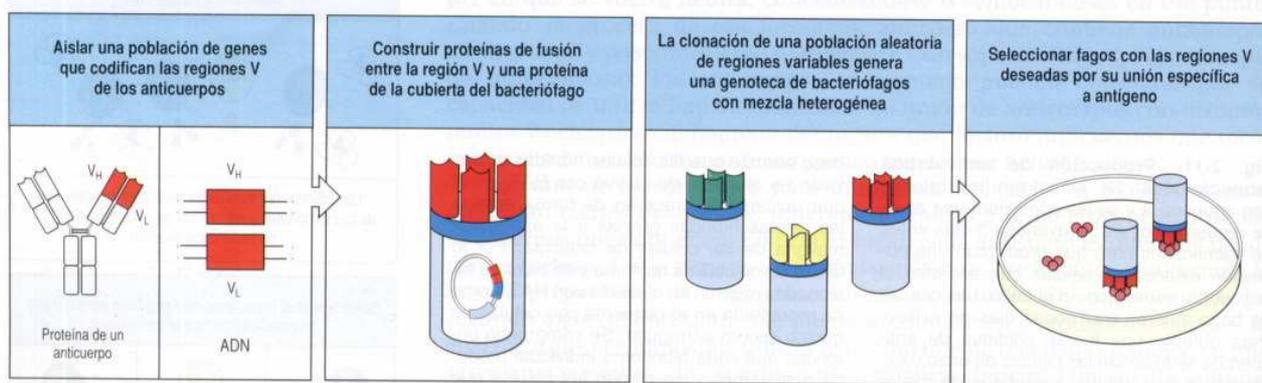
Figura 2. Esquema de la preparación de hibridomas para la obtención



de anticuerpos monoclonales homogéneos contra un antígeno.

Recientemente se ha descubierto una técnica alternativa para la producción de moléculas análogas a los anticuerpos. Los segmentos génicos que codifican los dominios variables (**V**) responsables de la unión al antígeno se fusionan con los genes que codifican una proteína de la cubierta de un bacteriófago. Los bacteriófagos que contienen dichos genes se emplean para infectar bacterias, y los fagos que crecen presentan cubiertas que expresan la proteína de fusión análoga a los anticuerpos, con los dominios de unión a antígeno en su superficie. Un conjunto de fagos recombinantes, cada uno de los cuales presenta un dominio de unión a antígeno en su superficie se denomina **genoteca de expresión de fagos**. Podemos aislar fagos que expresen dominios específicos frente a un antígeno concreto de interés. Los

fagos que se recuperan se pueden emplear para infectar bacterias de nuevo, y así establecer clones. Cada fago producido producirá una partícula monoclonal con capacidad de unión específica a antígeno de forma análoga a un anticuerpo monoclonal (ver figura 3). Los genes que codifican el sitio de unión, pueden recuperarse del ADN del fago (mediante digestión con enzimas de restricción) y emplearse en la construcción de genes que codifiquen la molécula completa de anticuerpo, empalmándolos con las partes de los genes de inmunoglobulina que codifican las regiones constantes. Dichos genes generados se reintroducen en una célula huésped adecuada (mielomas no productores de anticuerpos) para producir los anticuerpos monoclonales semejantes a los producidos por hibridomas.



**Fig. 2-12. Producción de anticuerpos por ingeniería genética.** Se emplean oligonucleótidos cortos complementarios de secuencias consenso de los genes de las regiones variables (V) de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) y ligeras ( $V_L$ ) de inmunoglobulina a fin de generar mediante reacción en cadena de polimerasa una genoteca de ADN de las regiones V de las cadenas pesada y ligera (v. fig. 2-30), empleando ADN de bazo como material de partida. Dichos genes de la región V de las cadenas pesada y ligera se clonan aleatoriamente en un bacteriófago filamentososo, de manera que cada fago exprese sólo una cadena pesada y otra ligera como una proteína de superficie con propiedades análogas a las de un anticuerpo. La genoteca de expresión de fagos se multipli-

ca en bacterias, y los fagos se unen entonces a una superficie recubierta de antígeno. Los fagos no unidos se lavan, y los unidos se recobran para multiplicarlos en bacterias y repetir de nuevo el ciclo pegándolos a antígeno. Tras unos pocos ciclos, sólo quedarán fagos específicos de antígeno, que se unen a éste con afinidad elevada. Dichos fagos pueden emplearse como análogos de anticuerpos o bien recobrar sus genes V para producir anticuerpos recombinantes mediante ingeniería genética con genes de anticuerpos (no se muestra en la ilustración). Esta tecnología podría reemplazar la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales, ya que presenta la ventaja de que los seres humanos pueden ser fuente de ADN.

## 2.4. Ingeniería tisular: Órganos artificiales

La meta de la ingeniería de tejidos es la de poder fabricar órganos que sirvan de recambio en el organismo y eviten el rechazo. La obtención de los grandes órganos sólidos del organismo, como el hígado, riñón o corazón todavía está lejana, aunque es el objetivo a desarrollar por varios laboratorios de ingeniería de tejidos. Sin embargo, actualmente ya hay tejidos artificiales sometidos a ensayos clínicos, como el cartílago sintético (Fig. 3), o que incluso se están utilizando en clínica como los diferentes tipos de piel sintética (TransCyte y Apligraf) obtenidos por diversos laboratorios y que se utilizan en el tratamiento de quemaduras extensas o úlceras de difícil cicatrización.

### 2.4.1. Tejidos sintéticos obtenidos en el laboratorio

A la izquierda se muestra una estructura formada por cartílago que imita la forma de una oreja. A la derecha se muestra una película de piel

artificial similar a la que ya se está utilizando en clínica.



Existen dos grandes estrategias para obtener órganos *in vitro*. Una de ellas consiste en hacer proliferar las células adecuadas sobre una matriz o armazón polimérico, cuya función es ayudar a conseguir la estructura tridimensional adecuada. Este procedimiento exige:

1. La multiplicación de las células características del tejido en cultivo. El conocimiento de la biología de estas células y sobre todo de las señales que inducen su multiplicación (factores de crecimiento) es fundamental.

2. Desarrollo, en muchos casos, de matrices de polímeros sintéticos biodegradables que proporcionan un andamio para el crecimiento de las células y la formación del tejido. Estas matrices pueden ser reabsorbidas con el tiempo como ocurre con las suturas internas.

3. El desarrollo de vasos sanguíneos que proporcionen nutrientes y permitan el intercambio gaseoso en el caso de que el espesor del tejido sea superior a 1mm.

En general, las matrices biodegradables y porosas, con una estructura adecuada al tejido, se siembran con las diferentes células que componen ese tejido.

Otra estrategia consistiría en conseguir *in vitro* o *in vivo* que las células se diferencien directamente en el órgano o tejido deseado, lo que resulta difícil con los conocimientos actuales. Veremos a continuación algunas de las características de las células y matrices poliméricas empleadas en la primera estrategia.

## **Las células**

La situación ideal es que los tejidos y órganos artificiales pudieran ser transplantados sin ningún rechazo. Esto sólo es posible si se utilizan células del propio individuo o compatibles con él. La obtención, cultivo y expansión de algunos tipos celulares como los fibroblastos es relativamente sencillo, pero este caso no es una generalidad. Sin embargo, en estos últimos años se ha obtenido un logro que puede tener un papel decisivo en la

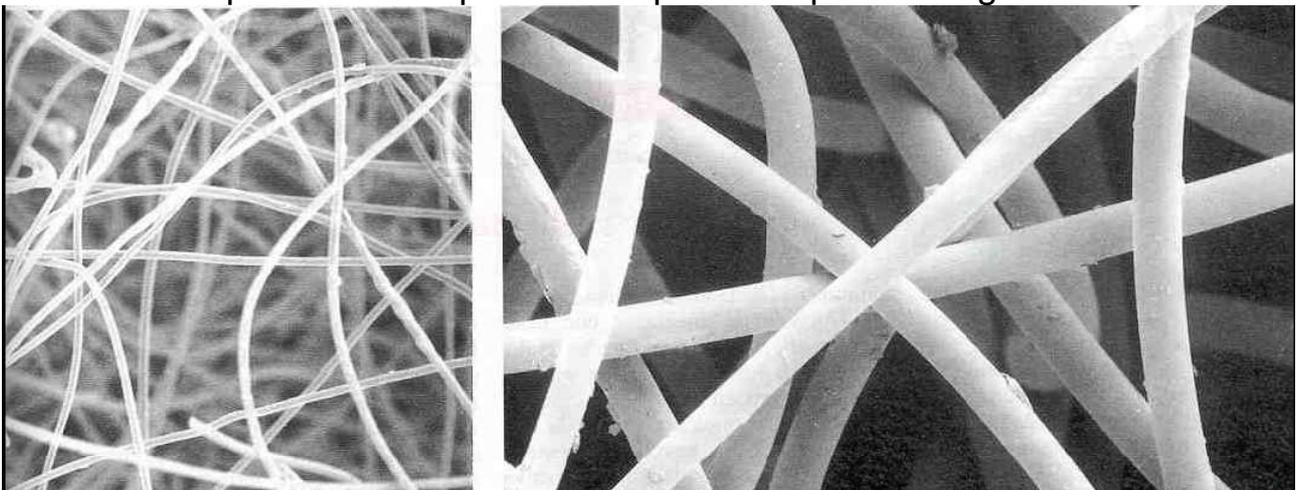
creación de tejidos vivos artificiales: se han podido aislar y cultivar **células madre embrionarias humanas**, también denominadas **células pluripotentes embrionarias**. Estudiaremos mas adelante las características de estas células, así como otras aplicaciones.

También es necesario desarrollar mecanismos avanzados para crecer células a gran escala en bioreactores que contengan sensores que permitan la adecuación de la cantidad de nutrientes, la presión de oxígeno, y demás requerimientos del cultivo. Otro aspecto importante es el de potenciar las cualidades mecánicas de los tejidos en crecimiento ya que muchos se adaptan a tensiones, compresiones y estiramientos. Por ejemplo el cartílago artificial aumenta de tamaño y contiene más cantidad de colágeno si se cultiva en recipientes rotatorios que exponen al tejido en desarrollo a variaciones en las fuerzas de fluido.

### La matriz polimérica o andamio

Las matrices que sirven de molde para el desarrollo de los tejidos están formadas bien con materiales sintéticos biodegradables, o bien de compuestos naturales como el colágeno. Los materiales sintéticos ofrecen la ventaja de poder ser manipulados para controlar su resistencia, velocidad de degradación y microestructura cuando se generan. Sin embargo, las células se adhieren mejor a los compuestos naturales. Se busca ahora unir las mejores cualidades de ambos para desarrollar nuevas generaciones de materiales con propiedades específicas.

En la parte superior de la siguiente figura se muestra la estructura microscópica de una matriz polimérica artificial. Debajo a la izquierda se muestra una imagen macroscópica de la matriz que recuerda la forma de una nariz. A la derecha se muestra la misma matriz después de ser sembrada por condriocitos que han ido suplantado el polímero por cartílago.

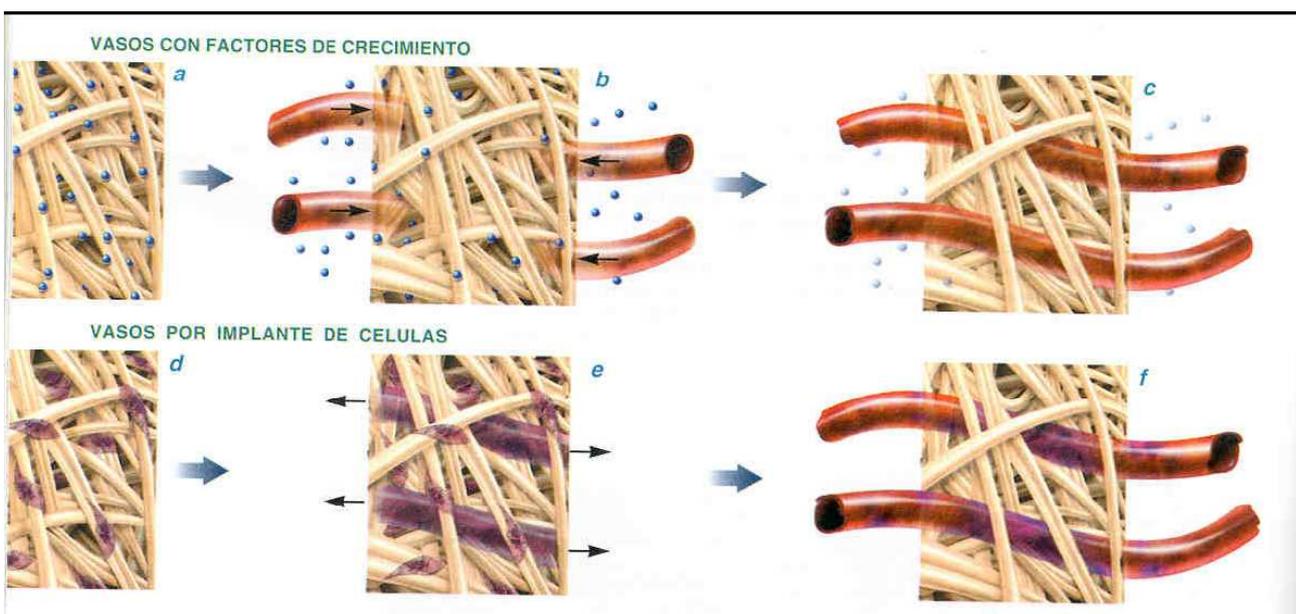


Un problema importante en el desarrollo de cualquier tejido viene determinado por el tamaño que limita el acceso de nutrientes y oxígeno a las células del interior. Esto implica otra condición necesaria que es la vascularización de las estructuras sintetizadas. Para lograr el desarrollo de vasos sanguíneos en estas estructuras, se están utilizando fundamentalmente los dos abordajes experimentales que se muestran en la siguiente figura. Bien se enriquecen las matrices poliméricas con sustancias que promueven la infiltración de vasos sanguíneos a partir de tejidos vecinos (paneles a, b y c), o bien se siembran las matrices con células endoteliales y factores de crecimiento adecuados que estimulan su crecimiento y la



formación de nuevos vasos (paneles d, e y f).

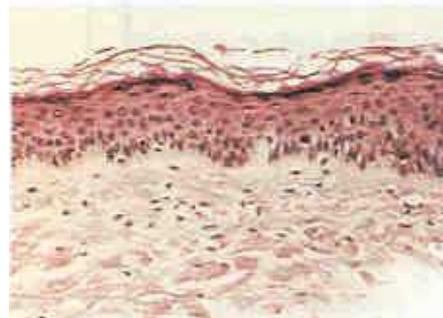
**Esquema de los dos métodos utilizados para garantizar la vascularización de tejidos u órganos artificiales.**



## Algunos ejemplos de tejidos y órganos biosintéticos

### Piel

La piel artificial se desarrolla sobre una matriz de colágeno en la que se infiltran fibroblastos, creando así una estructura que imita la dermis; sobre este sustrato se depositan queratinocitos que crecen hasta tapizar totalmente el sustrato, creándose una estructura parecida a la de la piel. Como fuente para obtener tanto fibroblastos como queratinocitos se utilizaron prepucios procedentes de la circuncisión de recién nacidos. En la figura se muestra una imagen macroscópica y microscópica de esta piel biosintética que ya es comercial. Se han desarrollado otros tipos de piel artificial que contienen únicamente el estrato dérmico. La piel artificial ejerce sus efectos terapéuticos a través de la cobertura de las heridas, con lo que impide la infección y evita la deshidratación si la superficie afectada es muy extensa, como en el caso de algunas quemaduras. Además, las células que forman parte de ella segregan factores de crecimiento y otro tipo de señales que estimulan la cicatrización por parte del paciente.



**Imagen macroscópica y microscópica de un tipo de piel artificial (Apligraf, desarrollada por la compañía americana Organogénesis). Esta piel contiene dos estratos celulares diferenciados que imitan a la dermis y la epidermis de la piel natural.**



## **Tejidos en tres dimensiones**

El desarrollo de tejidos en tres dimensiones se encuentra en fase de experimentación animal. Se han construido artificialmente vejigas de orina, vasos sanguíneos y válvulas cardíacas. El proceso es similar al descrito: desarrollo de la matriz polimérica que sirve de sostén y guía a las células, y siembra controlada con los diferentes tipos celulares presentes en el órgano o tejido.

## **Válvula cardíaca bioartificial de plástico biodegradable**

En la imagen se muestra cómo se siembra la matriz polimérica con células de endotelio vascular. Tras la implantación en animales de experimentación se espera la degradación paulatina de la matriz sintética que será suplantada por proteínas naturales.



## **2.5. Células pluripotentes**

### **Definición y localización de las células pluripotentes**

Las células pluripotentes pueden ser definidas como células con una capacidad ilimitada para autorenovarse (dividirse) y para diferenciarse en distintos tipos celulares. La investigación sobre este tipo de células ha despertado el interés de la comunidad científica y de las empresas biotecnológicas especialmente desde 1999, año en el se comprobó que

pueden ser cultivadas a partir de fetos humanos procedentes de abortos o embriones inviábiles después de fecundaciones *in vitro*. Además, recientemente se ha demostrado que los organismos adultos también tienen células multipotentes con capacidad para formar distintos tipos celulares. El uso de embriones suscita intensos debates éticos, sin embargo, la utilización de células adultas plantea menos problemas de este tipo. La investigación sobre células pluripotenciales sienta las bases para la obtención de tejidos e incluso órganos que podrían ser utilizados para tratar muchas patologías humanas. Estamos asistiendo al nacimiento de un campo que dará sus frutos en cuanto a la aplicación clínica en los próximos años.

La obtención de células pluripotentes humanas permitirá tratar enfermedades degenerativas como el Parkinson, Alzheimer, distrofias musculares, lesiones medulares, diabetes, etc. A más largo plazo la obtención de órganos completos a partir de este tipo de células podría hacer posible el transplante de órganos perfectamente compatibles con el receptor. Para hacer posible estas aplicaciones, antes es necesario conocer los mecanismos que controlan la diferenciación celular, para intentar reproducirlos y manipularlos *in vitro*. El proceso de diferenciación celular es tremendamente complejo, ya que en él intervienen una gran cantidad de factores. La identificación y análisis de los principales factores que gobiernan el proceso de diferenciación es uno de los objetivos de los científicos que trabajan en este campo.

### **La diferenciación celular es un proceso de programación genética**

El proceso de diferenciación implica la regulación de la expresión de una gran cantidad de genes. Por tanto, no es más que un complicado mecanismo de regulación de la expresión génica en el que intervienen una gran cantidad de factores, como ha quedado de manifiesto anteriormente.

La diferenciación en los tejidos humanos suele producirse por **divisiones asimétricas** de las células madre pluripotentes. En cada división celular de una célula madre, una de las células hijas continúa en su estado de indiferenciación, mientras que la otra queda comprometida en el proceso de diferenciación. Esta asimetría sucede en toda una población celular. La diferenciación es regulada por factores celulares internos y externos.

### **Controles intrínsecos del destino celular**

Las divisiones celulares asimétricas implican que las dos células hijas pueden adquirir diferentes potencialidades de desarrollo debido a: i) segregación (distribución) desigual de moléculas determinantes del destino celular entre las células hijas (especialmente proteínas del citoesqueleto) y ii) diferencias en los microambientes de cada una de ellas.

Los factores de transcripción juegan un papel fundamental en el proceso de diferenciación. Se han identificado algunas de estas moléculas implicadas en la hematopoyesis (por ejemplo el factor denominado SCL/Tal-1) y en diferenciación de células epidérmicas y del epitelio intestinal del ratón

(familia de factores de transcripción Tcf/Lef).

El número de divisiones celulares que puede experimentar una célula una vez que ha abandonado su localización original está determinado por varios mecanismos, entre los que se pueden destacar: i) la longitud de los telómeros, dependiente de la expresión de telomerasa; ii) control de la concentración de moléculas promotoras o inhibidoras del ciclo celular.

### **Controles externos: el nicho de las células pluripotentes**

El **nicho** que ocupan las células pluripotenciales está formado por el conjunto de señales externas que forman el microambiente donde se localizan éstas. Entre los elementos que forman el nicho tenemos:

- a) Factores secretados.
- b) Proteínas integrales de membrana, mediadoras de interacciones celulares.
- c) Matriz extracelular e integrinas.

Entre los factores secretados se encuentran dos familias de moléculas, los factores de crecimiento de fibroblastos (TGFs-beta) y los Wnts. Estas moléculas están muy conservadas estructural- y funcionalmente en distintas especies. Wnts es un activador de la transcripción por medio de una ruta compleja en la que interviene la b-catenina. Otro de estos factores secretados es PEDF (factor derivado del epitelio pigmentado de la retina), recientemente descrito como factor de nicho que incrementa la auto-renovación de las células madre neuronales de individuos adultos (Ramirez *et al.* Nature Neuroscience, 2006).

Entre las proteínas integrales de membrana que intervienen en la diferenciación celular se encuentra el receptor Notch y su ligando Delta.

La adhesión a la matriz extracelular está mediada por varias clases de receptores, entre los que se encuentran las integrinas. Para el mantenimiento de células pluripotentes de la epidermis se necesita la expresión de niveles elevados de integrinas beta-1. Por otra parte, estas integrinas controlan la diferenciación de queratinocitos y otros tipos celulares a través de la ruta de la MAP quinasa. Las integrinas mantienen a las células en el lugar adecuado dentro de un tejido. Si se altera la expresión de las integrinas, las células pueden quedar libres para abandonar el nicho y comenzar un proceso de diferenciación o apoptosis. Por otra parte, la matriz extracelular puede secuestrar y modular la concentración local de factores segregados en el nicho de las células pluripotentes.

### **Plasticidad de las células madre transplantadas**

Se han obtenido datos experimentales que indican que determinadas células multipotentes obtenidas de tejidos adultos son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares después de ser transplantadas. Existen casos donde esto sucede dependiendo de que el origen embrionario de los tejidos donante y receptor esté relacionado. Sin embargo, se han descrito casos en los que no es necesaria la existencia de esta relación,

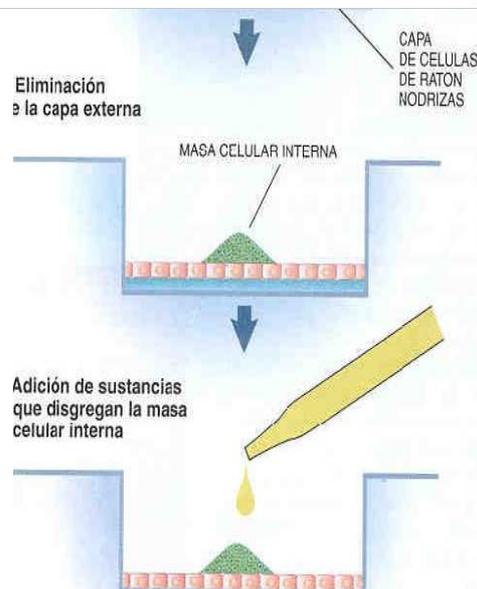
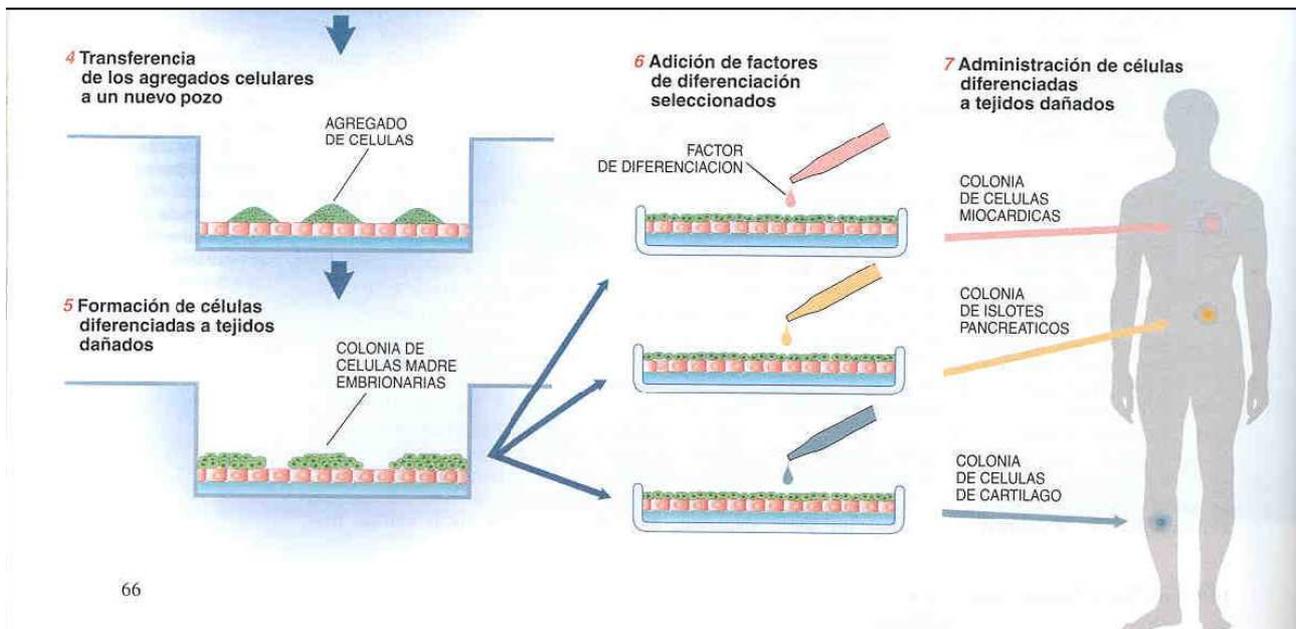
como por ejemplo el de células “nerviosas” multipotentes capaces de producir células sanguíneas. Estos hallazgos permiten ser optimistas en cuanto a las posibles aplicaciones clínicas de este tipo de células madre adultas.

### **Localización**

Se encuentran tanto en tejidos embrionarios como adultos. Las células pluripotentes embrionarias derivan de la masa celular interna del blastocisto y son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular adulto. Las células multipotentes adultas son capaces de diferenciarse en un número más restringido de tipos celulares. Las células multipotentes adultas tradicionalmente se han estudiado en tejidos como la sangre, la epidermis y las células germinales, aunque también están presentes en otros tejidos con escasa capacidad de regeneración como el hígado y el cerebro. Su función en estos tejidos consiste en reemplazar las células perdidas como consecuencia de lesiones o del proceso normal de senescencia. Las células de los tejidos adultos se originan a partir de las embrionarias por un proceso de diferenciación. Experimentalmente, la localización precisa de estas células en los tejidos se realiza mediante la identificación de marcadores moleculares, ya que morfológicamente suelen ser indistinguibles de las células diferenciadas. Otras fuentes de células embrionarias son los carcinomas embrionarios y células derivadas de las tres capas germinales del embrión.

Las células embrionarias humanas se pueden mantener *in vitro* en su estado indiferenciado de manera relativamente sencilla, cultivándolas sobre una capa de fibroblastos murinos irradiados, en un medio que contiene suero fetal bovino. Los fibroblastos murinos se irradian para inactivar su capacidad de dividirse y evitar que interfieran con el crecimiento de las otras células. Además proporcionan factores esenciales para el mantenimiento de las células pluripotentes. Las células embrionarias en cultivo mantienen durante mucho tiempo su actividad telomerasa y una gran estabilidad cromosómica, por lo que son capaces de dividirse prolongadamente *in vitro*, a diferencia de lo que sucede con otros tipos celulares, facilitando su manejo, y el estudio de su diferenciación. Cultivadas en condiciones adecuadas son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares, entre los que están las células hematopoyéticas.

Por otra parte, cuando se cultivan en suspensión, originan agregados multicelulares compactos denominados cuerpos embrioides donde coexisten células diferenciadas e indiferenciadas, evolucionando eventualmente desde esa estructura parecida a una mórula, hacia la formación de cavidades entre los 7 y 14 días de desarrollo. La diferenciación *in vitro* es bastante desorganizada y varía de unos embrioides a otros, indicando que el proceso está gobernado por una serie de factores desconocidos y que por tanto varían de unos experimentos a otros.

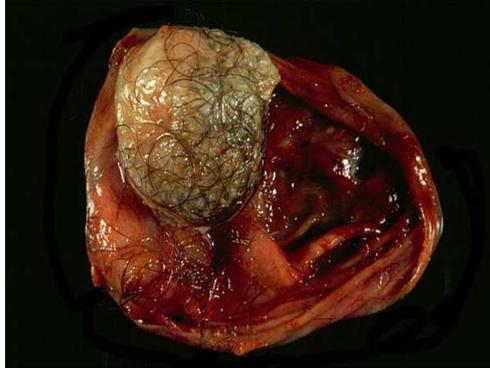


Esquema que muestra el procedimiento seguido para el aislamiento y diferenciación de células madre embrionarias pluripotentes hacia diferentes tipos celulares.

Los datos expuestos anteriormente ponen de manifiesto las enormes dificultades que existen en la actualidad para conseguir la diferenciación de las células pluripotentes hasta formar tejidos u órganos, ya que los factores que determinan el proceso no son conocidos y por tanto no pueden ser reproducidos *in vitro*. Por ello se ha recurrido a la diferenciación de células pluripotentes *in vivo*. De esta forma se logra exponer a las células a un ambiente en el que los factores que intervienen en su diferenciación pueden estar presentes. Así por ejemplo, la inyección de células embrionarias humanas en ratones inmunodeficientes (para evitar el rechazo) forman **teratomas** (tumores benignos de origen embrionario) en los que es posible identificar músculo liso, músculo estriado, hueso, cartílago, glomérulos fetales, epitelio respiratorio, pelo, ganglios, epitelio neural, etc. Por tanto, una estrategia para conseguir órganos destinados al trasplante puede ser el implante de células embrionarias en determinados órganos

animales o humanos.

La siguiente figura muestra un teratoma ovárico benigno, donde puede observarse cómo las células embrionarias se han diferenciado en tejido sebáceo, pelos y sangre. El transplante de células embrionarias humanas en animales puede reproducir esta situación y bajo condiciones adecuadas permitiría obtener el órgano o tejido requerido para el transplante.



## 2.6. Transplante de células

El objetivo de la terapia celular es reparar, reemplazar o potenciar la función biológica de tejidos u órganos dañados. Para ello se puede transplantar células, aisladas y bien caracterizadas, en número suficiente en un órgano o tejido diana, en unas condiciones tales que puedan sobrevivir el tiempo necesario para restaurar la función alterada.

Las células implantadas pueden liberar factores solubles tales como péptidos, proteínas, hormonas, neurotransmisores, etc., necesarios para corregir la alteración que se desea tratar.

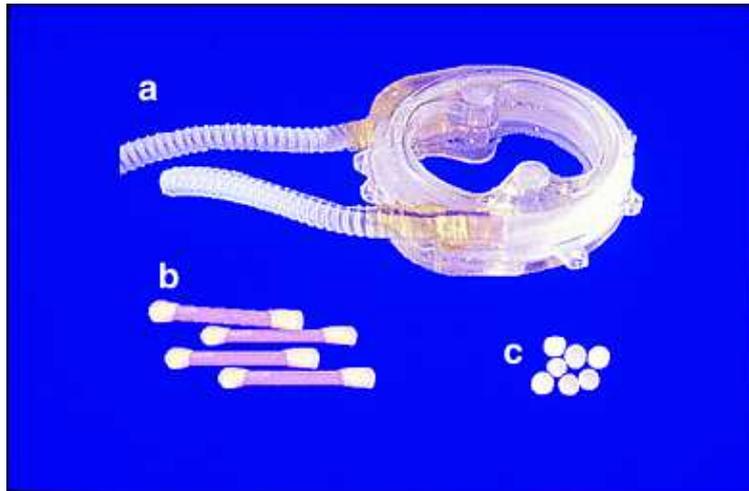
Las células que pueden ser mejor utilizadas con este fin son aquellas fácilmente accesibles y que además pueden ser multiplicadas *in vitro*, tales como los fibroblastos, células musculares y células hematopoyéticas. Estas células pueden ser manipuladas genéticamente y reimplantadas en el propio donante, evitando de esta manera el problema de rechazo. Esta es práctica habitual en algunas estrategias de terapia génica, como ya se ha estudiado.

La siguiente tabla muestra algunas enfermedades potencialmente tratables mediante transplante de células.

Enfermedad	Tipo celular transplantado
Diabetes	Islotes de Langerhans
Insuficiencia hepática	Hepatocitos
Dolor crónico	Células adrenales cromafines
Enfermedad de Parkinson	Células nerviosas fetales
Enfermedad de Huntington	Células productoras de factores tróficos
Enfermedad de Alzheimer	Células productoras de factores tróficos
Esclerosis lateral amiotrófica	Células productoras de factores tróficos
SIDA	Células de la médula osea
Hipocalcemia	Células paratiroides
Hipercolesterolemia	Hepatocitos
Hemofilia	Células productoras de factores de coagulación
Lesión de la médula espinal	Células nerviosas fetales
Anemia	Células productoras de eritropoyetina
Enanismo	Células productoras de hormona de crecimiento

Los pacientes que sufren diabetes tipo I tienen una disminución de células productoras de insulina en los islotes pancreáticos de Langerhans. El trasplante de estas células podría evitar la inyección de insulina, proporcionando un mejor control de la concentración sanguínea de glucosa y eliminando los efectos devastadores a largo plazo del control inadecuado de la glucemia. El empleo de células heterólogas para el trasplante tiene como principal inconveniente el rechazo. Para evitar este problema se han desarrollado dispositivos que aíslan a las células transplantadas del sistema inmune del receptor. Este método es conocido como inmuno-aislamiento. Las células transplantadas son confinadas en el interior de una membrana que permite el intercambio de nutrientes, gases, insulina y moléculas pequeñas, mientras que moléculas grandes como los anticuerpos no pueden atravesarla, impidiendo las reacciones inmunitarias. Esta estrategia se puede aplicar, además de a la diabetes, a otras enfermedades como la insuficiencia hepática, y el Parkinson. Se han diseñado varios dispositivos para practicar el inmuno-aislamiento. Entre ellos están los que se conectan directamente al torrente sanguíneo y otros en forma de varillas o cápsulas que se implantan en la cavidad abdominal o bajo la piel.

**Dispositivo para el inmunoaislamiento de células y tejidos.** Las células se sitúan en el interior del dispositivo, en una cámara rodeada de una membrana permeable sólo a moléculas de pequeño tamaño. El dispositivo se implanta formando un puente en el sistema circulatorio del paciente (a). Alternativamente las células se pueden situar en cámara alargadas (b) o microcápsula (c) que se implantan en la cavidad abdominal o debajo de la piel.



En 1980 se realizaron transplantes de células fetales en roedores para tratar la enfermedad de Parkinson, comprobándose que las células transplantadas se integraban en el animal receptor y que mantenían su actividad dopaminérgica, necesaria para suplir el déficit de este neurotransmisor, responsable de la enfermedad de Parkinson. Numerosos estudios posteriores han confirmado que las células dopaminérgicas transplantadas sintetizan y liberan dopamina, establecen conexiones con las neuronas del receptor y disminuyen los efectos del déficit del neurotransmisor. Estos estudios se realizaron también en primates demostrando que pueden ser eficaces en animales superiores. En 1995 comenzó la realización de ensayos clínicos en los que se han transplantado células dopaminérgicas procedentes de fetos humanos a enfermos de Parkinson. Se ha demostrado que las células transplantadas sobreviven y se integran en el individuo receptor, produciendo una mejoría de los síntomas. Como en el caso de los órganos, existe una seria limitación de disponibilidad de células fetales humanas para estos tratamientos. En 1997 se publicaron los resultados de otro ensayo clínico realizado con células fetales de cerdo. Los 12 enfermos del estudio, todos ellos con Parkinson avanzado, mostraron una mejoría de los síntomas que duró hasta dos años. Estos resultados muestran la viabilidad de los xenotransplantes y nos hace pensar que en el futuro próximo asistiremos a importantes avances en este campo.

**Células multipotenciales hematopoyéticas.** Estas células son útiles para tratar una gran cantidad de enfermedades que afectan a la producción de células sanguíneas, entre las que se encuentran procesos malignos como las leucemias y linfomas. En los individuos adultos se encuentran en la sangre periférica y por tanto fácilmente accesible en unas pequeñas cantidades (menos del 0,1% de todas las células nucleadas). No pueden ser distinguidas por su morfología por lo que hay que recurrir a técnicas que permiten identificar marcadores moleculares como la proteína CD34. Entre estas técnicas está la citometría de flujo. Para aumentar su proporción en la sangre circulante se suele tratar a los donantes con factores

de estimulantes de colonia recombinantes. La sangre del cordón umbilical también contiene células hematopoyéticas multipotenciales, por lo que en los últimos años se está recogiendo para guardarla por si fuera de utilidad para tratar enfermedades sanguíneas que pueda padecer el recién nacido en el futuro, como las comentadas anteriormente. En los Estados Unidos de América, ya hay empresas que recogen esta sangre en el momento del nacimiento, y la almacenan congelada hasta que su uso pueda ser necesario, aunque de momento no garantizan que el procedimiento pueda tener ninguna utilidad. Entre estas empresas están Viacord (<http://www.viacord.com/home/home.asp?section=1>), Lifebank (<http://198.104.188.92/>) y cryocell (<http://www.cryo-cell.com/>). Entre paréntesis se indican las páginas web de las compañías por si el estudiante tiene curiosidad por este tipo de actividades. La última empresa cobra 275 dólares por la recogida de la sangre y 50 dólares por cada año de almacenamiento.

Una de las ventajas del transplante de células multipotentes es que no necesita el conocimiento exhaustivo de los mecanismos de diferenciación. Además de las dificultades comentadas anteriormente, para controlar la diferenciación de las células pluripotentes, existe el problema del rechazo inmunológico si se emplean células de otro individuo. Para evitar el rechazo se pueden utilizar varias estrategias. Comentaremos tres de ellas:

1. Manipulación genética de los genes HLA
2. Clonación terapéutica.
3. Obtención de quimeras hematopoyéticas.

Los genes HLA de la célula donante pueden ser “eliminados” *in vitro* (*knock-out*) para disminuir la inmunogenicidad. Sin embargo, ello no anula completamente el rechazo, por lo que también puede ser necesario modificar algunos de estos genes para conseguir la tolerancia.

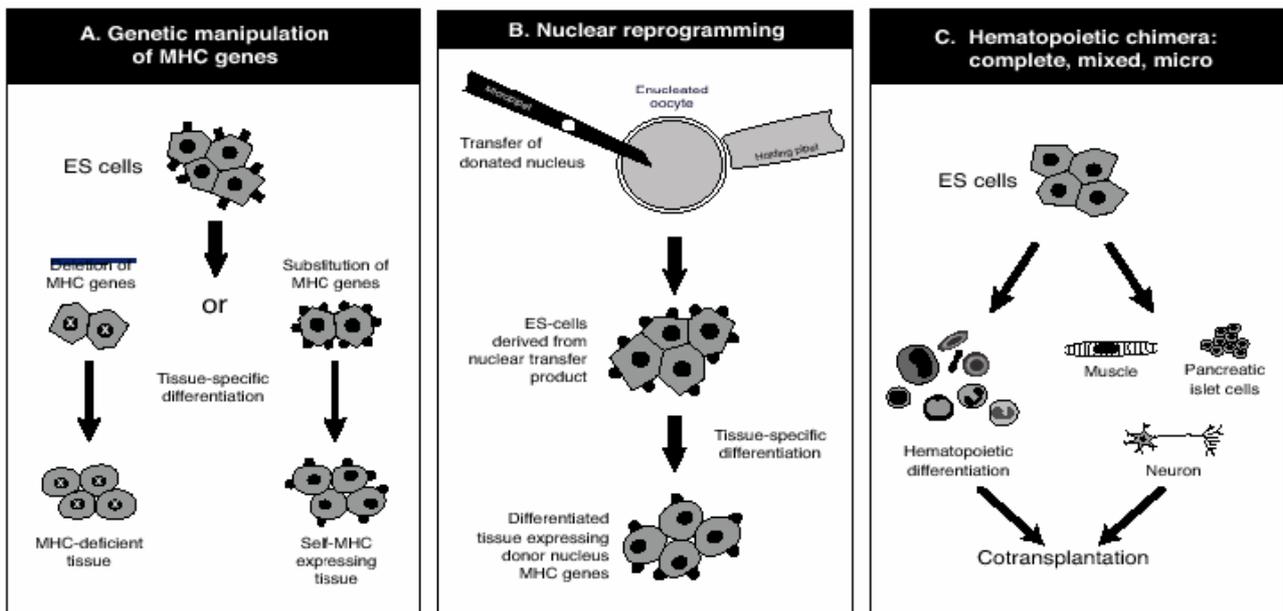
**La clonación terapéutica** puede permitir obtener células embrionarias pluripotentes perfectamente toleradas por el receptor. Para ello el núcleo de una célula adulta del receptor es transplantado en un óvulo al que previamente se le ha extraído su material genético, como se vio en el módulo anterior. El embrión obtenido en el estadio de blastocisto proporcionaría las células pluripotentes necesarias para el tratamiento. Esta estrategia plantea evidentes problemas éticos, ya que para muchos, entre ellos la iglesia católica, un embrión en estado de blástula es un ser humano y por lo tanto impedir su desarrollo no es aceptable. Sin embargo, cabría preguntarse qué es un ser humano y si un conjunto de células humanas constituyen un ser humano. A la hora de realizar esta reflexión convendría tener en cuenta que el núcleo de cualquier célula humana encierra la potencialidad de formar un individuo.

**La tercera estrategia** se basa en transplantar células hematopoyéticas y un segundo tejido obtenido a partir de las mismas células pluripotenciales que las hematopoyéticas. El transplante de las células

hematopoyéticas consigue que el receptor sea una quimera hematopoyética, ya que produce leucocitos que proceden de las células transplantadas y por tanto son compatibles con el segundo tejido transplantado puesto que tienen el mismo origen.

En cualquier caso se requiere al menos un tratamiento inmunosupresor inicial durante el transplante de las células hematopoyéticas, aunque este puede ser relativamente suave. Esta aproximación está basada en la comprobación de que individuos transplantados de médula ósea que han recibido un segundo transplante, habitualmente de riñón, del mismo donante han mostrado inmunotolerancia al segundo transplante.

Estas estrategias se reflejan en la siguiente figura:



Posibles estrategias para evitar el rechazo inmunológico de las células pluripotentes transplantadas (*Stem Cells*. 2001;19:193-204).

## Células madre cancerosas

Como hemos visto anteriormente, las **células madre** han llegado a ser “famosas” por su capacidad de curar determinadas enfermedades, generando esperanzas de que un día puedan llegar a solventar la enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, y una amplia variedad de otras patologías humanas. Pero ahora, un creciente número de investigadores están llegando a la conclusión de que las células madre son también la fuerza oculta detrás de una de las enfermedades humanas más temidas: el cáncer. Recientes investigaciones indican que dentro de cada tumor se “esconde” una pequeña población de células evasivas y de alto poder proliferativo, que impulsan el crecimiento del tumor. Bajo un microscopio parecen idénticas a otras células cancerosas, pero estas **células madre cancerosas** encierran el poder de producir tumores más o menos de la misma manera que las células madre normales pueden

regenerar los diferentes tejidos del cuerpo. Y además, estas células parecen ser resistentes a los medicamentos tradicionales empleados contra el cáncer, lo que explicaría por qué los pacientes pueden aparentemente ser curados de algunos cánceres, para luego ver reaparecer la enfermedad. Desde hace décadas se ha postulado la posible conexión entre las células madre y las células cancerosas. Las células madre, que aparecen en muchos tejidos del cuerpo humano adulto -desde la piel y la sangre hasta el cerebro- son únicas porque tienen la capacidad de generar grandes cantidades de otros tipos celulares. Se han detectado este tipo de células madre tumorales en cáncer de mama, leucemia, cáncer cerebral, etc. Actualmente se está llevando a cabo la primera prueba en pacientes de una terapia enfocada a eliminar estas células madre. El descubrimiento de estas células madre cancerosas proporciona una nueva diana terapéutica prometedora para combatir el cáncer, y asimismo está obligando a realizar un profundo cambio en la investigación del cáncer. Hoy, la mayoría de los tratamientos intentan reducir el tamaño del tumor, pero los nuevos resultados indican que el tamaño del tumor es casi irrelevante: solo si se consigue eliminar estas células madre, el tumor será aniquilado.

Sin embargo, el camino necesario para conseguir este objetivo será difícil. Simplemente poder diferenciar las células madre cancerosas es complicado, y requiere laboriosos ensayos en busca de características moleculares de una célula madre para poder separarlas, y analizar si efectivamente son capaces de desarrollar nuevos cánceres.

## **Alternativas a la utilización de células madre embrionarias en el desarrollo de una medicina regenerativa y reparadora**

El procedimiento técnico de la clonación, cuando se ha aplicado a la especie humana, no está suficientemente perfeccionado, pues no hay que olvidar que para obtener los tres embriones que se consiguieron en los primeros ensayos, se utilizaron 71 óvulos. Para obtener el material genético se utilizaron fibroblastos dérmicos. La transferencia nuclear se aplicó a 19 óvulos, de los que tres se desarrollaron hasta un estadio de 6 células, muriendo antes de que se pudieran desarrollar en los mismos las células madre útiles para la regeneración de tejidos.

La alternativa al uso de células madre embrionarias es utilizar células madre de cordón umbilical, de placenta o incluso de abortos espontáneos. En la actualidad, la fuente de células madre con mayores posibilidades clínicas en un futuro inmediato, son las células madre de tejidos adultos. Por ello, se incluyen como ejemplos algunos de los últimos avances sobre esta materia, como base objetiva para propiciar la investigación y uso de las mismas.

### **1. Utilización de células madre de tejidos adultos**

Hace ya una década que se demostró la posibilidad de transformar

células madre obtenidas a partir de diversos tejidos adultos, en células diferenciadas pertenecientes a su mismo tipo celular (Proc Natl Acad Sci 89; 8591, 1992/Science 255; 1717, 1992/Proc Natl Acad Sci 94; 14832, 1997). A partir de entonces dos descubrimientos han marcado el desarrollo sobre el conocimiento y utilización de las células madre de tejidos adultos, y han abierto el camino para su uso potencial en un amplio abanico de enfermedades. El primero fue comprobar que las células madre de algunos órganos adultos, como la médula ósea, mostraban mucha más plasticidad de lo que en principio se creía, pudiendo incluso transformarse en células madre multipotentes (Proc Natl Acad Sci USA 94; 4080, 1997/Science 279; 1528, 1998 / Neurosurgery 48; 2-16, 2001). El segundo fue que las células madre se detectaron también en órganos tales como cerebro y músculo, que previamente se creía que carecían de ellas, y que podían cultivarse indefinidamente, y después dirigir su diferenciación hacia células del tejido de origen u otro distinto (Proc Natl Acad Sci 94, 4080, 1997). Se ha conseguido generar células nerviosas o células musculares a partir de células madre de médula ósea. Durante estos últimos años muchas experiencias han confirmado la posibilidad de obtener diferentes tipos celulares a partir de células madre del propio tejido o de otro distinto.

Una de las dificultades importantes para la más amplia utilización de las células madre de tejidos adultos es la dificultad de obtenerlas, dado su escaso número, aunque ya existen resultados que indican que este problema podrá ser solventado en los próximos años.

Sin embargo, la formación de tejidos u órganos completos a partir de estas células madre aparece como una posibilidad mucho más remota. En relación con este último punto, investigadores de la Universidad Washington ha conseguido cultivar células madre sobre una matriz de laminina, consiguiendo que se alineen a lo largo de estas fibras formando una estructura muy similar a la del miocardio (Lancet 356; 1500, 2000). Este podría ser el primer paso para la consecución de tejido cardiaco, pero todo ello está aún muy distante de la posibilidad de conseguir órganos completos.

## **2. Utilización de células somáticas adultas, tras conseguir que se transformen en células madre**

Con respecto a la posibilidad de transformar, desdiferenciándolas, células somáticas adultas hasta células madre, y que posteriormente puedan ser cultivadas para obtener células de su propio tejido o de otro, las experiencias son muy reducidas. Existen resultados publicados en los que se logró transformar células adultas de piel de vaca en células madre multipotentes, y obteniendo posteriormente de ellas células de músculo cardiaco.

## **3. Utilización de células somáticas adultas para conseguir otras células y tejidos.**

Con respecto a la posibilidad de conseguir a partir de células

somáticas adultas, sin transformarlas a células madre, células de otro tejido, también los resultados experimentales son muy escasos. Existen resultados que muestran la posibilidad de obtener condrocitos a partir de adipocitos humanos obtenidos a partir de restos de liposucción, y obtener una estructura similar al tejido cartilaginoso, lo que supondría un paso de gigante para la consecución de cartílagos humanos con el fin de reparar lesiones utilizando la propia grasa del paciente.

## **Potenciales aplicaciones clínicas de las células madre**

### **1. Reparación de tejidos por inclusión en los mismos o en el torrente circulatorio del paciente, de células madre de ese mismo tejido procedentes de otro sujeto.**

En diversas experiencias se ha comprobado que las células madre de un determinado tejido pueden unirse a ese mismo tejido dañado y diferenciarse hacia células adultas sanas, tanto cuando se inyectan directamente en el tejido, como cuando se introducen indirectamente a través del sistema circulatorio. Por el momento, no se conoce exactamente cual es el mecanismo por el que las células madre reconocen al tejido dañado y llegan hasta él; pero sin duda, esta capacidad puede aprovecharse para reconstruir tejidos lesionados, o incluso para transportar diversos medicamentos hasta ellos. En relación con este último punto, existen ya resultados en los que se muestra que células madre portadoras de un gen “terapéutico” inyectadas en diferentes regiones del cerebro de ratas emigran hacia el tumor, lo rodean, y eliminan un gran número de células patológicas, disminuyendo así el tamaño del mismo.

### **2. Reparación de tejidos por inclusión en los mismos de células madre adultas de otro tejido o de cordón umbilical**

Durante estos últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en este campo. Si se inyectan directamente células madre de médula ósea en el corazón, se pueden transformar en células de músculo cardiaco. Actualmente, un grupo de investigación de Valladolid está llevando a cabo ensayos clínicos para tratar el infarto de miocardio mediante la inclusión de células de la médula ósea, y los primeros resultados son prometedores.

También ha sido posible regenerar el tejido nervioso deteriorado tras un ictus cuando se inyectan por vía circulatoria células de cordón umbilical en animales lesionados. Es decir, en todas las experiencias anteriores se demuestra la posibilidad de utilizar células madre de tejidos adultos, que pueden ser inyectadas en distintos órganos, como corazón, músculos, hígado, pulmón o intestino, y transformarse in situ en células de esos tejidos.

### **3. Células madre obtenidas de fetos abortados**

En febrero de 2000 se publicaron unos trabajos en los que se demostraba que las células madre procedentes de cordón umbilical de fetos abortados, tratadas adecuadamente con ácido retinoico y hormonas de crecimiento, e inyectadas en el sistema sanguíneo de ratas en las que se había provocado un ictus, favorecían su recuperación.

## **APLICACIONES CLINICAS ACTUALES**

Como se ha presentado anteriormente, el trabajo de los últimos años en materia de células madre de tejidos adultos sugieren que van a poder ser aplicadas en la práctica clínica en un futuro próximo. Dada la multiplicidad de datos, únicamente se enumeran algunos de ellos. Así, células madre de tejidos adultos se han aplicado ya con finalidad terapéutica en las siguientes patologías:

### **1. Tumores:**

- 1.1. **Tumores cerebrales.** Cancer Invest 18, 492-493; 2000.
- 1.2. **Meduloblastomas y glioblastomas.** Con supervivencia de más de 34 meses en los primeros y más de 4 años en los segundos. J Neurooncol 44; 147-153, Sept., 1999.
- 1.3. **Gliomas malignos recurrentes y meduloblastomas en niños,** obteniéndose largos periodos de supervivencia libres de enfermedad. Pediatr Transplant 1; 87-95; 1999.
- 1.4. **Neuroblastomas.** J Clin Oncol 17; 3216-3220, 1999.
- 1.5. **Neuroblastoma metastásico** en niños. Baillieres Best Practice Research in Clinical Haematology 12; 247-259, 1999.
- 1.6. **Retinoblastoma deseminado recurrente.** Una segunda remisión de más de 4 años. Bone Marrow Transplant 27; 653-655, 2001.
- 1.7. **Retinoblastoma metastásico.** Una segunda remisión de más de 4 años. Cancer 89; 2117-2121, 2000.
- 1.8. **Cáncer de ovario.** Ann Intern Med 133; 504-515, 2000.
- 1.9. **Epitelioma ovárico.** Sem Oncol 25; 349-355, 1998.
- 1.10. **Cáncer de testículo.** J Clin Oncol. 18; 3346-3351, 2000. Int J Urol. 7; 77-82, 2000.
- 1.11. **Sarcoma de partes blandas.** J Clin Oncol 18; 3643-3650, 2000.
- 1.12. **Tumores mesenquimatosos malignos.** Bone Marrow Transplant. 26; 627-632, 2000.
- 1.13. **Mieloma múltiple y leucemias.** Utilizando células madre de cordón umbilical. N Engl J Med. 344; 1815-1822, 2001.
- 1.14. **Linfomas no-Hodgkin.** Intern Med 40; 471-474, 2001.

2. **Enfermedades autoinmunes** (Esclerosis múltiple, lupus eritematoso, artritis reumatoide juvenil y artritis reumatoide). Mejorías objetivas obtenidas tras trasplante de células madre

adultas autólogas.

3. **Escleromixedema.** Arch Dermatol. 137; 1071-1072, 2001.
4. **Esclerosis múltiple.** Neurology. 57; 62-68, 2001.
5. **Enfermedad de Cronh.** Reuters Health, Agosto 13, 2001.
6. **Artritis reumatoide.** Arthritis Rheum 44; 754-760, 2001.
7. **Lupus eritematoso.** Arthritis Rheum 44; 728-731, 2001.
8. **Policondritis.** Arthritis Res 2; 327-336, 2000.
9. **Citopenias autoinmunes.** Blood 96; 3272-3275, 2000.
10. **Inmunodeficiencias.** Utilizando células madre de médula ósea. Blood 96; 1239-46, 2000. Utilizando células madre de un banco de cordones umbilicales. J Pediatr 138; 570-3, 2001.
11. **Anemias.** Anemia de células falciformes, utilizando células madre de cordón umbilical de un hermano. Oncol 22; 437-400, 2000.
12. **Enfermedades de los huesos y cartílagos.** Trasplante de condrocitos autólogos. Cell Trasplant 10; 203-208, 2001. Trasplante alogénico de células mesenquimales de médula ósea en niños con osteogénesis imperfecta. Nat Med 5; 309-13, 1999.
13. **Alteraciones corneales.** Trasplante alogénico de células madre corneales obtenidas de cultivo. Cornea 29; 488-94, 2001. Trasplante de células madre de líquido amniótico. Cornea 20; 354-61, 2001. Br J Ophthalmol 85; 567-75, 2001.
14. **Infarto de miocardio.** Regeneración del tejido cardiaco lesionado por: Trasplante autólogo de células madre de médula ósea. Dtsch Med Wochenschr 126; 932-8, 2001.

Todos estos datos indican que las células madre adultas representan una adecuada alternativa a la utilización de células madre embrionarias, con vista a la regeneración y reparación de tejidos. Incluso más, algunos autores sugieren que las células madre adultas, con independencia de criterios éticos, es decir, desde un punto de vista estrictamente biomédico, son superiores a las células madre embrionarias para su uso en medicina, ya que tienen gran versatilidad biológica y son capaces de diferenciarse en muchos más tipos de células de lo que nadie había pensado. Aunque ciertamente tienen menor capacidad de diferenciarse que las células madre embrionarias, son más seguras y parecen mejor programadas para lograr precisamente lo que se busca en cada caso determinado.

Por otro lado, las células madre adultas pueden ser más adecuadas que las embrionarias de cara a la medicina reparadora, pues forman parte de un sistema natural de regeneración, lo que se ha demostrado porque cuando un tejido resulta dañado, células madre de la médula ósea migran en grandes cantidades hacia la zona lesionada con finalidad reparadora.

Finalmente, es posible que las células madre mesenquimales puedan ofrecer una ventaja adicional sobre las células madre embrionarias,

ya que al parecer aquellas están desprovistas de los marcadores moleculares que desencadenan el rechazo inmunológico, incluso parecen capaces de inhibir la propia respuesta inmunológica. Si esto se confirmara, se podría disponer de una fuente de células madre universal, sin que fuera necesario utilizar las del propio paciente. Las células madre adultas y, muy especialmente las células madre mesenquimales, pueden constituir una verdadera alternativa a las células madre embrionarias con vista a la medicina regenerativa y reparadora en este siglo XXI.

### 3.- PARTE SEGUNDA: TERAPIAS GÉNICAS

Una vez que se ha caracterizado el gen asociados a una enfermedad humana, se pueden utilizar las herramientas de genética molecular para determinar su función, y analizar los procesos biológicos en los que está implicado. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios nos permitirán diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

La terapia génica es la modificación genética de células de un paciente a fin de combatir alguna enfermedad. Esta amplia definición incluye muchas estrategias posibles, y puede implicar la transferencia de genes humanos, de segmentos de genes humanos en forma de doble cadena, de genes de otros genomas, de oligonucleótidos y de varios genes artificiales, por ejemplo, genes antisentido. Estas transferencias génicas pueden provocar la modificación genética de las células del paciente. En la mayoría de los casos, la terapia génica se diseña para modificar genéticamente a las células enfermas, pero algunas estrategias van deliberadamente dirigidas a las células sanas, especialmente células del sistema inmunitario, y constituyen una forma de vacunación.

#### 3.1.- Estrategias para la terapia génica

Debido a que las bases moleculares de las enfermedades pueden variar enormemente, algunas estrategias de terapia génica resultan particularmente adecuadas para determinados tipos de trastornos, mientras que otras son adecuadas para otros. Entre las principales enfermedades tratables por terapia génica se incluyen:

- **Enfermedades infecciosas** (resultan de la infección por patógenos víricos o bacterianos).
- **Cánceres** (continuación impropia de la división celular y de la proliferación celular como consecuencia de la activación de un oncogén, o de la inactivación de un gen supresor de tumor o de un gen de apoptosis).

- **Trastornos hereditarios** (deficiencia genética en un producto génico, o expresión inadecuada de un gen determinada genéticamente).
- **Trastornos del sistema inmune** (incluye alergias, inflamaciones y enfermedades autoinmunes).

La terapia génica actual es exclusivamente somática, es decir, la introducción de genes en células somáticas de un individuo afectado por una enfermedad. Las perspectivas de una terapia génica de células germinales humanas suscita muchos problemas éticos, y en la actualidad no está permitida. Es posible establecer diferentes estrategias de terapia génica según la base de la patogénesis:

- **Terapia de aumento génico.**- Para enfermedades causadas por la pérdida de función de algún gen, la introducción de copias adicionales del gen normal puede aumentar la cantidad del producto normal hasta un punto en el cual se restablece el fenotipo característico. Es importante que no se tengan requerimientos precisos sobre la cantidad de expresión del gen introducido para obtener una respuesta clínica incluso ante una expresión baja.
- **Supresión dirigida de células específicas.**- Esta estrategia general es popular en las terapias génicas contra el cáncer. Los genes se dirigen a las células tumorales y se expresan en ellas de manera que provoquen su eliminación. La eliminación directa es posible si los genes insertados se expresan para producir una toxina letal, o un precursor inactivo de ésta. La eliminación indirecta se basa en genes inmunoestimuladores que provoquen o potencien una respuesta inmune contra la célula diana.
- **Corrección dirigida de mutaciones.**- Si una mutación hereditaria produce una ganancia de función que resulta fatal para el organismo, se podría tratar de corregir específicamente esa mutación. Debido a las dificultades prácticas asociadas esta estrategia aún no ha sido aplicada.
- **Inhibición dirigida de la expresión génica.**- Si las células enfermas presentan un nuevo producto génico o la expresión inadecuada de un gen (como en muchos cánceres, enfermedades infecciosas, etc.) se pueden emplear diferentes sistemas encaminados a bloquear la expresión de un único gen en el ADN, el ARN o la proteína, con oligonucleótidos antisentido o anticuerpos intracelulares respectivamente.

### 3.2.- Tecnología de la terapia génica

Un aspecto esencial de la terapia génica es que los genes clonados tienen que ser introducidos y expresados en las células de un paciente para que la enfermedad pueda ser superada. En la transferencia de genes para terapia génica se han aplicado dos grandes estrategias generales como muestra la figura 1:

- Transferencia génica ex vivo.** Este proceso implica la transferencia inicial

de genes clonados a células en cultivo. Las células transformadas con éxito son seleccionadas, expandidas en cultivo in vitro e introducidas al paciente. Para evitar el rechazo por el sistema inmune de las células introducidas, se utilizan normalmente células autólogas: las células se recogen del paciente que será tratado, y se cultivan antes de ser reintroducidas en el mismo individuo. Resulta claro que esta estrategia sólo es aplicable a tejidos que pueden extraerse del cuerpo, modificarse genéticamente y ser devueltos al paciente, donde se implantarán y sobrevivirán por un largo período de tiempo (por ejemplo, células del sistema hematopoyético, células de la piel, etc.).

- **Transferencia génica in vivo.** En esta estrategia los genes clonados se transfieren directamente a los tejidos del paciente. Ésta puede ser la única opción posible para tejidos cuyas células individuales no pueden ser cultivadas in vitro en número suficiente (por ejemplo, células cerebrales) y/o cuyas células cultivadas no pueden reimplantarse a los pacientes de manera eficiente. Como no existe forma de seleccionar las células que hayan incorporado y expresado el gen foráneo, el éxito de esta estrategia depende de manera crítica de la eficiencia general de la transferencia y la expresión del gen foráneo.

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado mecanismos para evitar que ácidos nucleicos exógenos las colonicen. Sin embargo existen numerosos métodos físicoquímicos y biológicos que pueden utilizarse para transferir genes exógenos a células humanas. Se denominan vectores a los sistemas que ayudan a transferir genes exógenos a las células, facilitando su entrega y biodisponibilidad intracelular.

El tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden transferir es, en la mayoría de los casos, muy limitado, y por tanto suele ocurrir que el gen transferido no es un gen convencional. En lugar de ello se puede utilizar un minigén, construido artificialmente, y que contiene la secuencia codificante completa de la proteína (cDNA) que se quiere expresar, flanqueada por las secuencias reguladoras adecuadas que aseguren una expresión elevada. Estas secuencias pueden contener potentes promotores víricos que aseguran una expresión fuerte, o promotores inducibles o específicos de tejido si es necesaria una expresión más controlada.

Tras la transferencia génica, los genes insertados se pueden llegar a integrar en los cromosomas de la célula, o bien quedar como elementos genéticos extracromosómicos (episomas):

- **Genes integrados en cromosomas.**

La ventaja de integrarse en un cromosoma es que el gen puede perpetuarse por replicación cromosómica tras la división celular (figura 2) y se puede obtener una expresión de largo plazo y estable. Por ejemplo, en los tejidos formados por células en división activa, la clave es dirigir la modificación a las células madre (una población minoritaria de células precursoras indiferenciadas que dan lugar a las células diferenciadas

maduras del tejido). Las células madre no sólo dan lugar a las células maduras del tejido, sino que al mismo tiempo se renuevan ellas mismas. En consecuencia se trata de una población inmortal de células a partir de la cual deriva el resto de las células del tejido.

No obstante, la integración cromosómica tiene sus inconvenientes debido a que la inserción suele ocurrir casi al azar: la localización de los genes insertados puede variar enormemente entre células. En muchos casos, los genes insertados pueden no expresarse debido a su inserción en una región heterocromática muy condensada. En algunas ocasiones la integración puede provocar la muerte de la célula huésped (por ejemplo, por inserción en un gen crucial, inserción que lo inactiva). Una preocupación mayor es la posibilidad de cáncer: una integración en una de las muchas células que son manipuladas podría perturbar los patrones normales de expresión de genes que controlan la división o la proliferación celular, por ejemplo a través de la activación de un oncogén o de la inactivación de un gen supresor de tumores o de un gen implicado en apoptosis (muerte celular programada). La terapia génica ex vivo ofrece al menos la oportunidad de seleccionar las células en las que la integración ha tenido éxito, gracias a que estas células se amplifican en cultivo y se comprueba si sus fenotipos presentan alguna evidencia obvia de transformación neoplásica, como paso previo a su transferencia de vuelta al paciente.

#### **- Genes no integrados.**

Algunos sistemas de transferencia génica están diseñados para insertar genes en células donde pueden quedar como elementos extracromosómicos y tener una expresión elevada. Si las células están dividiéndose activamente, el gen introducido puede no segregarse igualmente a las células hijas, por lo que la expresión a largo plazo puede ser un problema.

## **Vectores de transferencia génica**

El método escogido para la transferencia génica dependerá de la naturaleza del tejido diana y de si la transferencia se hace ex vivo a células cultivadas, o in vivo a células del paciente. No existe un sistema de transferencia génica ideal; cada uno tiene sus limitaciones y ventajas. Los sistemas víricos de mamíferos, sobre todo de ratón, han sido particularmente atractivos debido a su elevada eficiencia de transferencia de genes a células humanas. Los virus utilizados en terapia génica han sido manipulados genéticamente para eliminar en lo posible genes implicados en la replicación vírica y en la patogenicidad; éstos son sustituidos por los genes que se quiere expresar en las células. Estos virus modificados no son capaces de originar partículas víricas en la célula que infectan (figura 3). Para multiplicar estos

virus son necesarias unas células especiales que contienen todos los genes que se han eliminado del virus, son las células de encapsulación. De esta forma nos aseguramos que el virus no se podrá desarrollar en las células donde hará terapia génica. En estos protocolos se han utilizado fundamentalmente retrovirus, adenovirus, y actualmente se intentan desarrollar vectores a partir de virus adenoasociados y del herpes simple:

## **A) Vectores derivados de retrovirus**

Los retrovirus son virus de ARN que tienen una función transcriptasa inversa importante, lo que les permite sintetizar una forma de ADN complementario de doble cadena capaz de integrarse en el ADN nuclear. El ADN integrado puede transmitirse de manera estable a las células hijas, ofreciendo la posibilidad de una cura permanente para una enfermedad. No se pueden obtener títulos muy altos de retrovirus, y sólo infectan células que se están dividiendo activamente ya que no pueden atravesar la membrana nuclear, y en la división ésta desaparece. En consecuencia, el uso de este tipo de vectores queda excluido para el tratamiento de tejidos compuestos de células que no se dividen (por ejemplo, neuronas, etc.). Sin embargo, esta misma propiedad resulta beneficiosa para la terapia génica de cánceres de tejidos que normalmente tienen células que no se dividen. Los vectores retrovirales murinos, muy utilizados, pueden acoger insertos de hasta 8 kb.

## **B) Vectores derivados de adenovirus**

Los adenovirus son virus de ADN que producen infecciones de las vías respiratorias superiores y tienen una atracción natural por el epitelio respiratorio, la córnea y el tracto gastrointestinal. A diferencia de los retrovirus, que sólo pueden infectar las células en división activa, los adenovirus pueden infectar una amplia gama de tipos celulares. Su entrada a las células es por endocitosis mediada por receptor (figura 4), y es un proceso eficiente, pero el ADN insertado no se integra, por lo que la expresión de los genes transferidos sólo puede ser sostenida durante períodos cortos. Se pueden producir adenovirus a títulos muy elevados, y aceptan insertos de hasta 78 kb. Debido a su capacidad de infectar muchos tipos celulares diferentes, se han utilizado para gran variedad de aplicaciones, notablemente en estrategias de terapia génica in vivo. Los vectores derivados de adenovirus pueden inducir la aparición de importantes respuestas inflamatorias.

## **C) Vectores de herpes simplex**

Estos vectores tienen atracción por el sistema nervioso central, y

pueden establecer infecciones latentes en las neuronas que duran toda la vida. No se integran, por lo que no es posible expresar durante mucho tiempo los genes transferidos. Se espera que sus principales aplicaciones sean dirigir genes a las neuronas para el tratamiento de enfermedades neurológicas, tales como el Parkinson, y para el tratamiento de tumores del sistema nervioso central. Pueden acoger insertos relativamente grandes (de más de 20 kb).

## **D) Vectores víricos adenoasociados**

Los virus adenoasociados son un grupo de virus de ADN pequeños de cadena sencilla que no son capaces de infectar sin que exista una coinfección de un virus colaborador, como por ejemplo un adenovirus. Si no hay coinfección por un virus colaborador, el AAV humano no modificado se integra en el ADN cromosómico, habitualmente en un lugar específico del cromosoma 19. La posterior superinfección con un adenovirus puede activar el ADN integrado del virus, generándose viriones. Los vectores AAV sólo pueden acomodar insertos de hasta 4,5 kb, pero tienen la ventaja de proporcionar expresión a largo plazo con un elevado grado de seguridad. Las preocupaciones en torno a la seguridad de los virus recombinantes, ya que existe la remota posibilidad de que los virus introducidos se puedan recombinar con otros salvajes generando progenies infectivas, han generado un interés creciente en sistemas de vectores no víricos alternativos para la terapia génica:

## **E) Inyección directa de ADN**

En algunos casos se puede inyectar ADN directamente en un tejido específico, por ejemplo el músculo, utilizando jeringa y aguja. Una estrategia alternativa a la inyección directa se basa en el bombardeo de partículas: se recubren bolitas de metales pesados con ADN, y estas bolitas recubiertas se disparan con un dispositivo especial de manera que penetran en las células de interés. Estas técnicas de inyección directa son sencillas y relativamente seguras. Sin embargo, la eficiencia de la transferencia génica es pobre, y se obtiene poca integración estable del ADN inyectado.

## **F) Endocitosis mediada por receptor**

El ADN de interés se acopla a una molécula directora, capaz de unirse a un receptor específico de la superficie celular, induciendo la endocitosis y transfiriendo así el ADN al interior de las células. El acoplamiento se realiza habitualmente uniéndose covalentemente la molécula directora a poli-lisina, y articulando la posterior unión (reversible) del ADN, cargado negativamente, al componente poli-lisina, de carga neta positiva.

Por ejemplo, los hepatocitos se distinguen por la presencia de receptores de asialoglucoproteína en su superficie, que eliminan las asialoglucoproteínas del suero. El acoplamiento del ADN a una asialoglucoproteína vía un polícatión como la poli-lisina puede dirigir la transferencia del ADN a células hepáticas vivas. La eficiencia de la transferencia génica puede ser alta, pero el método no está diseñado para permitir la integración de los genes transferidos.

## **G) Liposomas**

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de bicapas lipídicas sintéticas que imitan la estructura de las membranas biológicas. El ADN que se quiere transferir se empaqueta in vitro dentro de los liposomas y éstos se emplean directamente como vehículos de transferencia del ADN a un tejido diana in vivo (figura 5). La cubierta lipídica permite que el ADN no sea degradado in vivo, se una a las células y sea endocitado. Los liposomas se han transformado en vehículos populares para la transferencia en terapia génica in vivo debido a la gran seguridad que ofrecen. Sin embargo, la eficiencia de la transferencia génica es baja, y el ADN introducido no está diseñado para que se integre en el ADN cromosómico, por lo que la expresión de los genes transferidos es transitoria.

### **3.3. Terapia génica basada en la inhibición dirigida de la expresión génica in vivo**

Una forma de tratar ciertos trastornos humanos es inhibir selectivamente la expresión de un gen predeterminado in vivo. En principio, esta estrategia general resulta particularmente adecuada para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas, junto con algunos trastornos inmunológicos. En estos casos, las bases de la terapia génica están en la inactivación de la expresión de un gen específico responsable de la proliferación de las células cancerosas, infecciosas, responsables de la alergia, de la inflamación, etc. Esta inhibición no debe interferir con la función celular normal. Por ejemplo, la atención podría centrarse en la inhibición selectiva de un gen vírico particular que es necesario para la replicación vírica, o bien se podría inhibir un oncogén inapropiadamente activado, etc. La expresión de un gen seleccionado se puede inhibir mediante diferentes estrategias. Una de las posibles implica la mutagénesis específica in vivo, para que deje de ser funcional. La manipulación dirigida de genes mediante recombinación homóloga ofrece la posibilidad de realizar mutagénesis dirigida e inactivar un gen.

Sin embargo, esta técnica actualmente es muy poco eficaz. En lugar de ella en la actualidad se prefiere recurrir a métodos de inactivación de la expresión del gen sin mutarlo. En principio existen varios niveles en los

que esto se puede conseguir:

- a) en el **ADN** (bloqueando la transcripción)
- b) en el **ARN** (bloqueando el procesamiento postranscripcional, el transporte del ARNm, o la unión del ARN con los ribosomas)
- c) en la **proteína** (bloqueando el procesamiento postraduccional, la exportación de la proteína, u otros pasos que son cruciales para la función de la proteína codificada por el gen)

Los tres niveles permiten actualmente aplicar métodos de inhibición selectiva de la expresión génica. Las tres estrategias que se presentan a continuación actúan específicamente sobre cada uno de los tres niveles comentados.

**1. Terapia basada en la triple hélice**, implica la unión de oligonucleótidos con secuencias complementarias específicas al ADN diana bicatenario, originando una triple hélice que inhibe la transcripción específica del gen que tiene la secuencia complementaria.

**2. Terapia basada en secuencias antisentido**, implica la unión de oligonucleótidos o polinucleótidos, que contienen secuencias complementarias a ARNs específicos, impidiendo su traducción y por tanto inhibiendo la síntesis de polipéptidos. En algunos casos el elemento que se une puede ser una ribozima especialmente diseñada. Una ribozima es una molécula de ARN con capacidad catalítica, capaz de cortar el transcrito de ARN. Se pueden diseñar genéticamente ribozimas capaces de cortar algunas secuencias específicas de ARN. Una aplicación ha consistido en el diseño de ribozimas contra proteínas oncogénicas específicas y contra proteínas del virus HIV en terapia génica contra el SIDA.

**3. Terapias basadas en el bloqueo de proteínas.** Se pueden utilizar diferentes estrategias para inhibir la función de un polipéptido específico:

- **Anticuerpos intracelulares.**- La manipulación de anticuerpos se ha extendido al diseño de genes que codifican anticuerpos intracelulares, o intracuerpos. Este logro abre la posibilidad de utilizar los anticuerpos dentro de las células para bloquear la construcción de virus o proteínas perjudiciales, como las oncoproteínas. El primer ejemplo de esta estrategia fue la manipulación del anticuerpo F105, que se une a gp120, una proteína crucial de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que el virus del SIDA usa para unirse e infectar sus células diana.
- **Oligonucleótidos aptámeros.**- Son oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a secuencias determinadas de proteínas. La transferencia al interior de las células de grandes cantidades de un oligonucleótido aptámero

estabilizado químicamente puede resultar en la unión específica a un polipéptido predeterminado, bloqueando así su función.

- **Proteínas mutantes.**- En algunos casos, podría ser posible realizar terapia génica diseñando genes que codifiquen una proteína mutante capaz de unirse específicamente a una proteína predeterminada e inactivarla (una proteína que sea esencial para el ciclo vital de un patógeno). Por ejemplo, una forma de terapia génica para el SIDA pasa por la producción artificial de una proteína mutante del HIV-1, en un intento de inhibir la multimerización de las proteínas del núcleo vírico.

### 3.4. Terapia génica para enfermedades hereditarias

Existen varios trastornos genéticos diferentes que son susceptibles de ser tratados en mayor o menor grado mediante terapia génica. Para enfermedades genéticas no mendelianas recuentes, que pueden resultar de complejas interacciones entre loci diferentes y/o factores ambientales, las estrategias de terapia génica pueden no ser de fácil aplicación. Las enfermedades basadas en alteraciones de genes únicos, que afectan severamente a los individuos y que no tienen tratamientos efectivos constituyen los candidatos más obvios para la terapia génica. El número de genes aislados y caracterizados causantes de este tipo de enfermedades va en continuo aumento. Sin embargo, la existencia de diferentes patogénesis hace que algunos trastornos sean más susceptibles de tratar por terapia génica que otros.

Los trastornos que resultan de la deficiencia de un sólo producto génico específico suelen ser los más susceptibles de ser tratados por terapia génica: una expresión elevada de un alelo normal introducido debería bastar para superar la deficiencia genética. Las enfermedades hereditarias recesivas han sido candidatas de particular interés para la terapia génica, debido a que las mutaciones son casi siempre mutaciones de pérdida de función. Los individuos afectados presentan una expresión deficiente de ambos alelos y por tanto el fenotipo de la enfermedad se debe a una ausencia completa o casi completa de la expresión génica normal. Sin embargo, los heterocigotos tienen alrededor del 50% del producto génico normal, y normalmente son asintomáticos. En algunos casos existe una gran variación de la cantidad de expresión normal, por lo que un pequeño porcentaje del promedio normal de expresión del gen puede bastar para restablecer el fenotipo normal.

A pesar de que los trastornos hereditarios recesivos son los más susceptibles de recibir terapia génica, ciertos trastornos son menos susceptibles que otros. Además de la cuestión de la accesibilidad del tejido enfermo, algunos trastornos pueden ser difíciles de tratar por otras razones. Un buen ejemplo es la b-talasemia, asociada a mutaciones en el gen de la b-globina, una de las subunidades de la hemoglobina.

Ésta es una enfermedad grave, que afecta a cientos de miles de personas en todo el mundo, y es aparentemente una excelente candidata a recibir tratamiento por terapia génica: el gen es muy pequeño y ha sido muy bien caracterizado, y el trastorno presenta un patrón de herencia recesivo y afecta a células sanguíneas. Sin embargo es una mala candidata a terapia génica ya que la inserción de un gen de b-globina normal en las células deseadas debe ir seguida de un control muy estricto de su expresión: la cantidad de b-globina producida debe ser igual a la cantidad de a- globina. El desequilibrio entre las cadenas de globinas a y b resultaría en un fenotipo de talasemia.

Con todo lo excitante que resulta la perspectiva abierta por la terapia génica, las limitaciones de las tecnologías actuales son enormes. Hasta ahora la terapia génica ha curado un número muy reducido de pacientes. En lugar de ello, los ensayos realizados están proporcionando formas de tratamiento para algunos trastornos: puede existir mejoría, pero los efectos son temporales, y los tratamientos deben repetirse a intervalos regulares. Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos del progreso actual y de las dificultades:

### **Deficiencia de Adenosina deaminasa**

La primera terapia génica que tuvo éxito aparente se inició en 1990. El primer paciente fue una niña que sufría una enfermedad hereditaria recesiva muy rara, la deficiencia en adenosina desaminasa (ADA). La enzima ADA está implicada en la vía de rescate de las purinas para la degradación de los ácidos nucleicos, y es una enzima constitutiva sintetizada por muchos tipos celulares diferentes. Una deficiencia heredada en esta enzima incide particularmente en los linfocitos T, una de las clases principales de células del sistema inmune. La consecuencia es que los pacientes ADA presentan una inmunodeficiencia combinada grave. Esta grave enfermedad era particularmente accesible a la terapia génica por varias razones: el gen ADA es pequeño, y había sido clonado y estudiado de manera exhaustiva con anterioridad; las células diana son linfocitos T, que son de fácil acceso y cultivo, lo cual permite terapia génica ex vivo; el trastorno es de herencia recesiva y, cosa importante, la expresión del gen no está sometida a un control estricto (los individuos normales presentan un enorme rango en sus cantidades de enzima, que va del 10 al 5000% de las cantidades promedio). La observación que el trasplante de médula ósea podía curar la enfermedad sugirió que el trasplante únicamente de linfocitos T podría ser suficiente, y se había observado que la transferencia de genes ADA normal a linfocitos T ADA restauraba el fenotipo normal. Existen tratamientos alternativos para la deficiencia de ADA. De hecho, el tratamiento de elección es el trasplante de médula ósea siempre y cuando se disponga de un donante hermano perfectamente compatible en el sistema HLA. En estos casos se obtiene

cerca de un 80% de curaciones. Para niños que no disponen de esta opción, existe una opción alternativa, que es la terapia de sustitución enzimática.

Esta terapia consiste en inyecciones intramusculares semanales de ADA conjugada con polietilenglicol (PEG). El PEG estabiliza la enzima, permitiendo que sobreviva y funcione en el organismo durante días.

En esencia, la estrategia de terapia génica de ADA implicó cuatro pasos:

1. clonación de un gen normal de ADA en un vector retrovílico;
2. transfección del ADA recombinante a un cultivo de linfocitos T ADA derivados de la paciente;
3. identificación de los linfocitos T ADA+ resultantes, y expansión posterior mediante cultivo;
4. reimplantación de estas células en la paciente.

Esta estrategia es sólo un tratamiento, no una curación, ya que ésta requeriría la transferencia con éxito del gen normal a células madre de la médula ósea. El problema para conseguir la curación definitiva se debe a la enorme dificultad para aislar células madre de médula ósea y como consecuencia de ello se tuvo que administrar a la paciente inyecciones repetidas del enzima a distintos intervalos de tiempo. Ello ha dificultado evaluar la eficacia terapéutica del gen ADA. La medición de diferentes parámetros relacionados con la producción de anticuerpos y función de linfocitos T permitió obtener evidencias de que el tratamiento estaba teniendo el efecto deseado de estimulación del sistema inmune. En paralelo, se han obtenido evidencias de mejoría clínica: la frecuencia de infecciones ha disminuido enormemente cuando se compara con la incidencia antes del tratamiento. La eficacia de la terapia del gen ADA sigue siendo difícil de evaluar, debido a que los pacientes fueron tratados simultáneamente con PEG-ADA.

## **Hipercolesterolemia familiar**

Esta enfermedad está provocada por una deficiencia hereditaria dominante en los receptores de la lipoproteína de baja densidad (LDL), que normalmente son sintetizados en el hígado. Se caracteriza por la aparición prematura de enfermedades coronarias. Aproximadamente el 50% de los hombres heterocigotos afectados mueren hacia los 60 años, a no ser que reciban tratamiento. Debido a que es un trastorno genético muy común, de vez en cuando aparecen homocigotos. Estos individuos sufren la aparición precoz de la enfermedad y se va agravando progresivamente, muriendo de infarto de miocardio habitualmente hacia el final de la infancia.

El hígado, al ser un órgano interno sólido, puede no parecer la elección ideal para dirigir una terapia génica. Sin embargo, los hepatocitos

pueden cultivarse in vitro y, bajo estas condiciones, son susceptibles de ser infectados por retrovirus. La terapia génica ex vivo pasó a ser una posibilidad el día que se demostró en animales que los hepatocitos cultivados podían ser inyectados vía el sistema porta (las venas que drenan del intestino directamente al hígado) tras lo cual aparentaban anclarse en el hígado. La terapia génica supuso la remoción quirúrgica de una porción grande del lóbulo izquierdo del hígado del paciente, la disgregación de las células hepáticas y su siembra en cultivo antes de la infección con retrovirus que contenían un gen del receptor humano normal de las LDL. Las células genéticamente modificadas fueron reintroducidas en el paciente por infusión a través de un catéter implantado en una rama del sistema venoso portal. La relación LDL/lipoproteínas de alta densidad (HDL) bajó después de la terapia génica, y tal mejoría se mantuvo durante un período prolongado.

## **Fibrosis quística**

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva en la que hay un transporte defectuoso de iones cloruro a través de las células epiteliales, debido a mutaciones en un gen CFTR, que codifica un canal de cloro. La expresión primaria del defecto se encuentra en los pulmones: se acumula una secreción mucosa pegajosa que favorece las infecciones crónicas. Debido a que no hay métodos para cultivar células de pulmón rutinariamente en el laboratorio, se han adoptado estrategias de terapia génica in vivo. Como las células del epitelio respiratorio son células diferenciadas, no se pueden emplear vectores retrovíricos. En lugar de ello los ensayos de terapia génica se han realizado utilizando vectores de adenovirus o liposomas como vehículos para la trasfección de un minigén CFTR de tamaño adecuado. La vía de aplicación es la broncoscopia o a través de la cavidad nasal. El primer protocolo basado en adenovirus comenzó en 1993, y a pesar de que los datos preliminares han confirmado la transferencia del gen al epitelio respiratorio in vivo, hay importantes reservas respecto de la seguridad del procedimiento debido a reacciones inflamatorias importantes en el tratamiento con adenovirus.

### **3.5. Terapia génica contra el cáncer**

En marcado contraste con los pocos ensayos de terapia génica para los trastornos hereditarios, en la actualidad hay en curso numerosos ensayos clínicos de terapia génica contra el cáncer. Aunque en principio una terapia génica contra el cáncer exigiría un conocimiento profundo del origen de éste, en la mayoría de los casos la terapia génica permite la eliminación dirigida de las células cancerosas sin tan siquiera conocer su etiología molecular. Las principales estrategias utilizadas son:

### 3.5.1. Estrategias generales:

**Supresión artificial de células cancerosas.-** Se puede insertar en las células tumorales el gen codificante de una toxina (por ejemplo la cadena A de la toxina diftérica), o un gen que confiera sensibilidad a una droga o fármaco, genes asesino-suicidas, (por ejemplo la timidina quinasa del herpes símples). Muchos de estos genes provocan un efecto colateral en células adyacentes. Estas estrategias se están utilizando en el tratamiento de glioblastomas, tumores cerebrales muy agresivos.

**Estimulación de la supresión natural de las células cancerosas.-** Los tumores por su propia idiosincrasia no son inmunogénicos ya que de haberlo sido no hubieran prosperado. Se puede potenciar la inmunogenicidad de un tumor, por ejemplo, mediante la inserción de genes codificantes de antígenos foráneos o de citocinas, que son moduladores de la actividad del sistema inmune. La presencia de estas modificaciones producen una activación del sistema inmune que favorecía el reconocimiento tumoral.

Otra estrategia es el **desarrollo de vacunas recombinantes** para la prevención y **el tratamiento de tumores malignos**. Algunas células tumorales presentan en su superficie marcadores específicos, estos antígenos tumorales se expresan en bacterias atenuadas como el BCG, y se pueden utilizar para inmunizar frente a ciertos tumores (esta estrategia se está ensayando con melanomas).

**Protección de tejidos circundantes normales de los efectos de la quimio o radioterapia.-** La protección de tejidos de la toxicidad sistémica de la quimioterapia se puede conseguir, por ejemplo, introduciendo el gen de tipo 1 de resistencia a múltiples drogas.

### 3.5.2. Tumores que resultan de la activación de oncogenes:

**Inhibición selectiva de la expresión del oncogén.-** Se pueden dirigir oligonucleótidos antisentido o ribozimas específicas de gen para unirse y digerir el ARNm del oncogén. También se podría inhibir la transcripción del gen mediante la formación de hélices triples tras la transferencia de oligonucleótidos específicos y complementarios del gen. También se emplean anticuerpos intracelulares u oligonucleótidos aptámeros para unirse específicamente a la oncoproteína e inactivarla.

### 3.5.3. Tumores derivados de la inactivación de un supresor de tumores:

En estos casos se introduce en las células tumorales la forma salvaje del gen supresor de tumores que no era funcional en las células cancerosas. Hay ensayos clínicos de terapias de sobresión del gen p53 en tumores de pulmón

con resultados variables.

Aunque los ensayos génicos *ex vivo* son más frecuentes, en algunas terapias tumorales se administran *in vivo* vectores retrovirales que poseen la ventaja de que infectan especialmente a las células tumorales, ya que sólo infectan células en división activa. Estos ensayos se han realizado fundamentalmente en el tratamiento de tumores cerebrales.

En la tabla siguiente se muestran ejemplos de ensayos en curso de terapia génica contra el cáncer:

### **3.6. Terapia génica para enfermedades infecciosas**

Las estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas son ligeramente diferentes. Estrategias comunes con las terapias génicas contra el cáncer son la inducción de una respuesta inmune específica o la eliminación específica de las células infectadas. Además, y de forma cada vez más extendida, la terapia génica de enfermedades infecciosas permite plantear estrategias dirigidas a afectar el ciclo vital del agente infeccioso, reduciendo su capacidad de llevar a cabo una infección productiva. Algunos agentes infecciosos son genéticamente estables.

Sin embargo, existen otros que pueden estar en rápida evolución y, casi de la misma manera que las células cancerosas, resultan problemáticos para cualquier terapia general. El ejemplo clásico es el SIDA, donde el agente infeccioso, HIV-1, muta rápidamente.

Los ensayos clínicos en curso para tratar enfermedades infecciosas con terapia génica se dirigen fundamentalmente a tratar pacientes de SIDA. El agente infeccioso para este trastorno es una clase de retrovirus conocido como HIV-1, capaz de infectar linfocitos T colaboradores, un subgrupo de células del sistema inmune de importancia crucial. Existen tres características del HIV-1 que lo hacen especialmente perjudicial: i) acaba matando las células T colaboradoras (dejando en consecuencia al paciente susceptible a otras infecciones), ii) el provirus tiende a persistir en estado latente antes de activarse repentinamente (la falta de producción de virus durante la fase de latencia complica el tratamiento con fármacos antivíricos), y iii) la tasa de mutación del genoma de HIV-1 es muy elevada.

En principio, se pueden diseñar varias estrategias para tratar el SIDA con terapia génica. Como en el caso de la terapia génica anticancerosa, se puede intentar eliminar directamente a las células infectadas (insertando un gen que codifique una toxina o una prodroga), o se puede adoptar una estrategia indirecta, potenciando la respuesta inmune contra las células afectadas. Por ejemplo, se puede transferir un gen que codifique un antígeno de HIV1, tal como la proteína de la envoltura gp120, y

expresarlo en el paciente de forma que provoque una respuesta inmune contra el virus HIV-1, o bien se puede estimular el sistema inmune del paciente transfiriendo y expresando un gen que codifique alguna citocina, tal como un interferón. Otra estrategia general, aplicable a todos los trastornos causados por agentes infecciosos, es encontrar una forma de interferir con su ciclo vital. Existen varias estrategias disponibles, básicamente se ha intentado la inhibición a tres niveles:

- **Bloqueo de la infección.** El HIV-1 infecta normalmente a los linfocitos T, uniéndose a través de la proteína gp120 de su envoltura al receptor CD4 de la membrana del linfocito. La transferencia de un gen que codifica una forma soluble del antígeno CD4 (sCD4) a los linfocitos T o a células hematopoyéticas, y su expresión posterior, resultará en sCD4 circulante. Si la concentración de sCD4 circulante es suficientemente alta, cabe pensar que la unión de sCD4 a la proteína gp120 de los virus inhibirá la infección a los linfocitos T sin afectar a su función.
- **Inhibición de la síntesis de ARN viral.** La producción de ARN del HIV-1 puede ser inhibida selectivamente mediante estrategias estándar antisentido o de ribozimas, y también mediante el uso de señuelos de ARN que son secuencias cortas artificiales de ARN que pueden competir por la unión de proteínas reguladoras de la replicación del gen y posiblemente inhibir de esta forma la unión de estas proteínas con sus dianas fisiológicas.
- **Interferencia con la función de proteínas virales.** Existen numerosas estrategias diferentes. Una de ellas es el diseño de anticuerpos intracelulares contra las proteínas de HIV-1, como por ejemplo proteínas de la envoltura. Otra estrategia implica introducir genes que codifican proteínas de HIV-1 mutantes, capaces de unirse e inactivar proteínas de HIV-1.

## **4.- PARTE TERCERA: TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE**

### **4.1- CLONACIÓN ACELULAR Y CLONACIÓN CELULAR**

Antes de comenzar este apartado recordaremos el concepto de clonación. Entendemos por clonación el proceso de obtención de un clon, siendo un clon un conjunto de moléculas, células, tejidos, órganos o individuos, caracterizados por ser genéticamente idénticos o dicho de otro modo por contener la misma información genética, que es igual a la del elemento de partida, es decir el elemento que ha sido clonado. Por tanto podemos clonar desde moléculas hasta individuos completos. El proceso de clonación es pro tanto un mecanismo de amplificación genética. Se suele decir que cada uno de los elementos que constituyen un clon también es un clon.

Imaginemos que tenemos un clon de bacterias, formado por un conjunto de células genéticamente idénticas, nos podemos referir a cada una de esas células aisladas como un clon ya que al dividirse es capaz de formar otro conjunto de células genéticamente idénticas, es decir un clon.

La clonación es un proceso fisiológico, por ejemplo las células que forman un individuo son clónicas, todas ellas son genéticamente idénticas ya que se han originado por sucesivas divisiones del cigoto. Los gemelos univitelinos son individuos clónicos.

La clonación desde el punto de vista biotecnológico es interesante ya que constituye un procedimiento para la multiplicación de moléculas de ácidos nucleicos (ADN o ARN), células, tejidos o individuos completos bien sean animales o vegetales.

En esta parte del módulo nos estudiaremos la clonación de moléculas de ácidos nucleicos, fundamentalmente ADN. Para ello se pueden utilizar sistemas acelulares, basados en la amplificación en cadena de la polimerasa o PCR, o sistemas celulares, basados en la introducción de las moléculas que se desea clonar en células para su amplificación. Ello se realiza mediante la tecnología del ADN recombinante que estudiaremos en este módulo. El resto del módulo está dedicado a la clonación celular.

### **4.2. VECTORES DE CLONACIÓN**

El proceso de clonación celular básicamente consiste en unir la molécula que se desea clonar a otra, denominada vector, con la finalidad de que una vez introducida en una célula hospedadora adecuada (bacteria, levadura, células de mamíferos, etc.) pueda ser copiada (replicada) cuando ésta se divide. Para introducir fragmentos de ADN de interés en una célula hospedadora se necesitan unos vehículos que estabilicen el fragmento, permitan su replicación, y por lo tanto lo transmisión a la descendencia, así

como en algunos casos hagan posible su expresión. Tales vehículos se denominan vectores de clonación. Los vectores deben ser moléculas de ADN bien caracterizadas que posean un origen de replicación, y en algunos casos también deben tener señales para la expresión del fragmento que transportan. Existen varios tipos de vectores utilizados fundamentalmente para introducir ADN en bacterias:

**1.- Plásmidos.** Son pequeñas moléculas de ADN bicatenario circular que contiene muy pocos genes. Son intracelulares y se transmiten a las células hijas tras la división celular. Algunos de estos plásmidos contiene genes que confieren resistencia a fármacos a la célula bacteriana. Son especialmente útiles para la clonación de fragmentos de ADN pequeños en células bacterianas y eucariotas sencillas. También existen plásmidos que pueden ser utilizados para clonar ADN en células de mamíferos.

**2.- Bacteriófagos.** Son virus capaces de infectar bacterias. Suelen tener un and bicatenario, circular o lineal, y tienen vida fuera de las células que infectan. Nos permiten clonar fragmentos de hasta 23 kb. Estos vectores se utilizan normalmente para la obtención de genotecas de ADN genómico y de ADNc.

**3.- Cósmidos.** Vectores híbridos entre plásmidos y fagos. Permiten incorporar fragmentos de ADN de hasta 45 kb. Se forman incorporando al plásmido unos segmentos procedentes del genoma de bacteriófago  $\lambda$ , denominados sitios cos, los cuales son reconocidos por la maquinaria empaquetadora del fago, permitiendo el empaquetamiento del fragmento de ADN foráneo en el interior de partículas virales. Son muy empleados para construir bibliotecas genómicas. Los cósmidos recombinantes son empaquetados dentro de virus y se mantienen como plásmidos cuando infectan una bacteria.

**4.- Fagos de cadena sencilla.** Un ejemplo es el fago M13. Tras la infección de *E. coli* se convierte en una forma replicativa de doble cadena que puede ser purificada y utilizada en la clonación. Tras la infección, se obtienen fagos que contienen ADN de cadena sencilla que pueden ser utilizados directamente para determinar su secuencia de nucleótidos.

**5.- Vectores de expresión.** Contienen las secuencias necesarias para la expresión del ADN foráneo, es decir, contiene las señales necesarias para la transcripción y la traducción. Una estrategia muy utilizada consiste en clonar el ADN foráneo dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, con lo que los elementos de control de esta proteína (promotor, sitio de unión al ribosoma, etc.) son empleados para producir una proteína de fusión.

### **4.3.- CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE.CLONACIÓN DE GENES**

Los acontecimientos esenciales del proceso de clonación de una molécula de ADN son las siguientes:

1. Unión de la molécula de ADN, generalmente un fragmento, a un vector. La molécula resultante se denomina ADN recombinante o quimera.

2. El vector actúa como un vehículo transportando el fragmento de ADN al interior de la célula hospedadora.

3. En el interior de la célula hospedadora el vector recombinante se multiplica, produciendo copias idénticas de él mismo y por lo tanto del segmento de ADN que transporta.

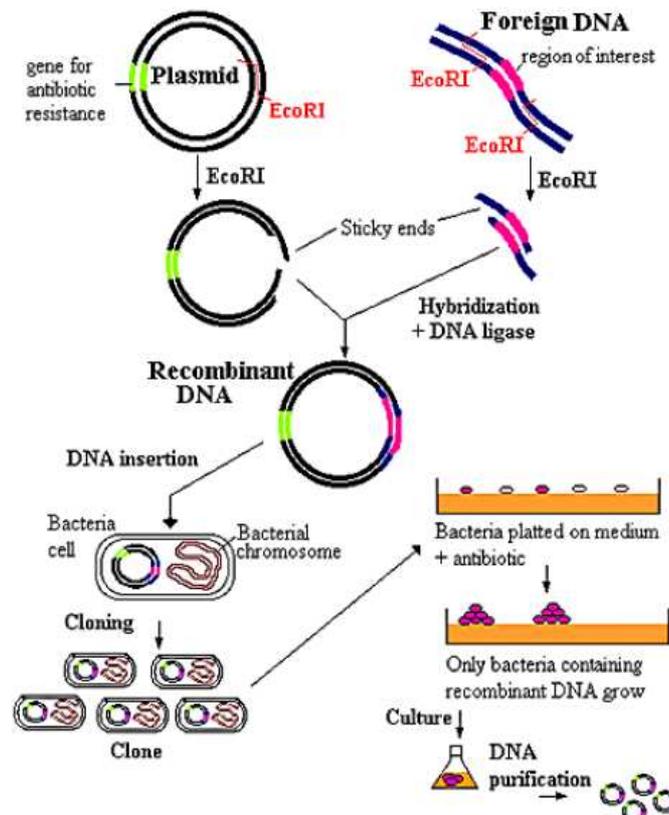
4. Cuando el hospedador se divide, se transmiten a la progenie copias de la molécula de ADN recombinante, donde se vuelve a multiplicar.

5. Después de un elevado número de divisiones celulares, la célula original ha formado un conjunto de células idénticas genéticamente, denominado clon, el fragmento de ADN transportado por la molécula de ADN recombinante se dice que ha sido clonado.

Por tanto, los pasos para clonar un fragmento de ADN son:

- Cortar el ADN que se desea clonar con una enzima de restricción.
- Cortar el vector con la misma enzima de restricción para obtener extremos compatibles.
- Sellar las uniones mediante la enzima ADN ligasa.
- Introducir el vector recombinante en el hospedador.
- Multiplicar el hospedador para obtener múltiples copias del fragmento de ADN.
- Purificar el plásmido recombinante amplificado o inducir la expresión del fragmento clonado.

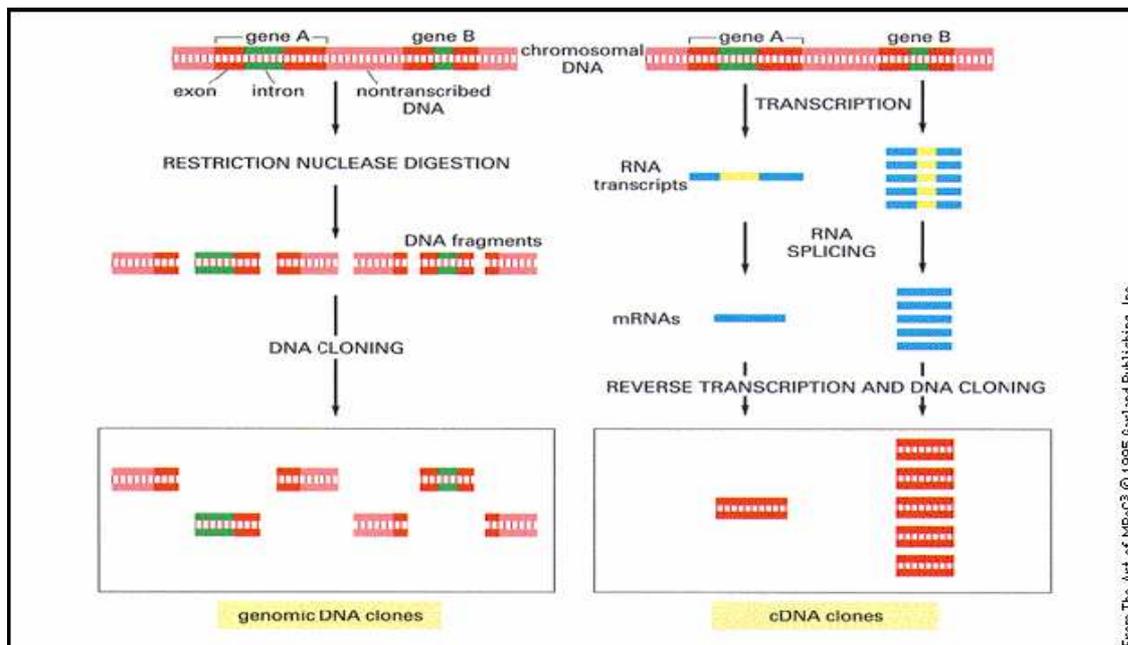
El proceso de clonación se ilustra en la siguiente figura:



Como se comentó anteriormente la clonación de una molécula de ADN permite amplificarla, obteniendo una gran cantidad de la misma con la finalidad por ejemplo de realizar estudios de tipo estructural, o bien obtener gran cantidad de la proteína que codifica.

#### 4.4.- CONCEPTO Y CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS

Una genoteca es una colección de fragmentos de ADN representativos de los genes o del ADN genómico de un organismo, tejido o célula. Las genotecas obtenidas a partir del ADN genómico se denominan genómicas, y las obtenidas a partir de los ARN mensajeros se llaman genotecas de ADNc o cDNA si conservamos el acrónimo inglés. Estas últimas están formadas por una colección de fragmentos de ADN que representan los genes que se expresan en un tejido, órgano o tipo celular determinado. Los fragmentos se encuentran contenidos en vectores adecuados, y estos se multiplican en células hospedadoras.



Así, puede definirse una biblioteca génica como un conjunto de clones que representa los genes o ARN mensajeros de un organismo, tejido o célula. Las principales características de la genotecas genómicas y de ADNc se resumen en la siguiente tabla:

### PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS GENOTECAS

Genómicas	cDNA
Representan a todos los genes de un organismo.	Representan a los mensajeros expresados en un tejido.
Fragmentos de DNA de elevado tamaño.	Fragmentos de DNA de menor tamaño.
No colas de poli-A.	Colas de poli-A.
Contienen secuencias reguladoras de la expresión génica (enhancers, sitios de unión de factores de transcripción, etc.).	No contienen secuencias reguladoras de la expresión génica.
Contienen secuencias codificadoras (exones) y no codificadoras (intrones).	Solo contienen secuencias codificadoras (exones).

Una vez obtenida la genoteca, tendremos representado en fragmentos (cada fragmento corresponderá a un clón) todo el genoma de la especie que estemos estudiando (si se trata de una genoteca de ADN genómico). Esta genoteca nos permitirá, por ejemplo, obtener un clón (mediante hibridación con una sonda específica) que contenga el fragmento de ADN donde se encuentra el gen que estamos buscando, permitiendo su secuenciación y caracterización.

En el caso de las genotecas de ADNc, podemos obtener distintos tipos, de forma que representen cada una de ellas los transcritos presentes en distintos tejidos, o bien obtener genotecas del mismo tejido, pero en diferentes estadios del desarrollo. Esta última clase de genotecas nos permitiría investigar por ejemplo qué genes que se expresan en un tejido en un momento dado del desarrollo. Como ya vimos en el módulo 2, este tipo de genotecas también son muy útiles cuando se lleva a cabo una estrategia de tipo funcional para identificar el gen asociado a una determinada enfermedad.

## 4.5.- MANIPULACIÓN GENÉTICA DE MICROORGANISMOS

Manipular genéticamente un organismo quiere decir alterar por parte del hombre su material hereditario, con algún propósito. Un tipo de manipulación frecuente consiste en introducir nuevas moléculas de ADN, para aumentar su número, para producir una proteína foránea en él, etc. La introducción de una molécula foránea de ADN en bacterias o levaduras sigue básicamente las siguientes etapas:

**Aislamiento del fragmento de ADN que queremos introducir.** Si pretendemos expresar una proteína utilizaremos únicamente su región codificante, sin la presencia de intrones. Los siguientes pasos se centran en el caso de que queramos expresar una proteína foránea en un microorganismo.

**Preparación de un gen quimérico que contiene la región codificante de la proteína de interés (ADNc)** unida a una región promotora característica de los genes del microorganismo. Con ello se persigue que obtener la transcripción eficaz del gen quimérico en el microorganismo. Muchas veces se utilizan promotores inducibles de forma que la síntesis de la proteína se inicie poco antes de recolectar los microorganismos para evitar que la expresión de la proteína interfiera con el crecimiento de la bacteria o levadura. **El gen quimérico se incorpora a un vector de expresión, que puede ser un plásmido.** El vector, además de las secuencias que permiten la unión de la ADN polimerasa para su replicación (sitio ORI), contiene un gen que permita distinguir y seleccionar aquellos microorganismos que incorporen el ADN

foráneo. Este gen se denomina de selección y puede:

- Conferir resistencia a algún antibiótico, lo que permitirá seleccionar a aquellos microorganismos que contengan este plásmido de los que no lo hallan captado.
- Permitir la síntesis de algún compuesto esencial para el crecimiento (por ejemplo algún aminoácido). Así las células que contengan este plásmido podrán crecer en un medio que carezca del compuesto y el resto no, siendo de esta forma seleccionadas.

**Introducción del vector que contiene el gen quimérico en el microorganismo hospedador.** Diferentes técnicas permiten este proceso, como la electroporación, en la que una corriente eléctrica de alto voltaje origina poros transitorios en la membrana plasmática permitiendo la entrada de los plásmidos al interior celular. También se puede someter a las células receptoras a un choque térmico con el fin de facilitar la entrada del ADN recombinante.

**Amplificación del vector recombinante y expresión de la proteína:** la amplificación se consigue mediante el crecimiento del microorganismo. El plásmido contiene secuencias de reconocimiento de la ADN polimerasa bacteriana que lo replica. Como se comentó anteriormente, cuando se considera que la amplificación del plásmido ya es adecuada, se procede a inducir la expresión del gen de interés para que la síntesis de la proteína se inicie poco antes de la recolección de las células.

**El crecimiento de las bacterias** a escala industrial se realiza en grandes biorreactores que proporcionan el ambiente necesario para el crecimiento, con temperatura adecuada y suministro constante de nutrientes y eliminación de productos de deshecho.

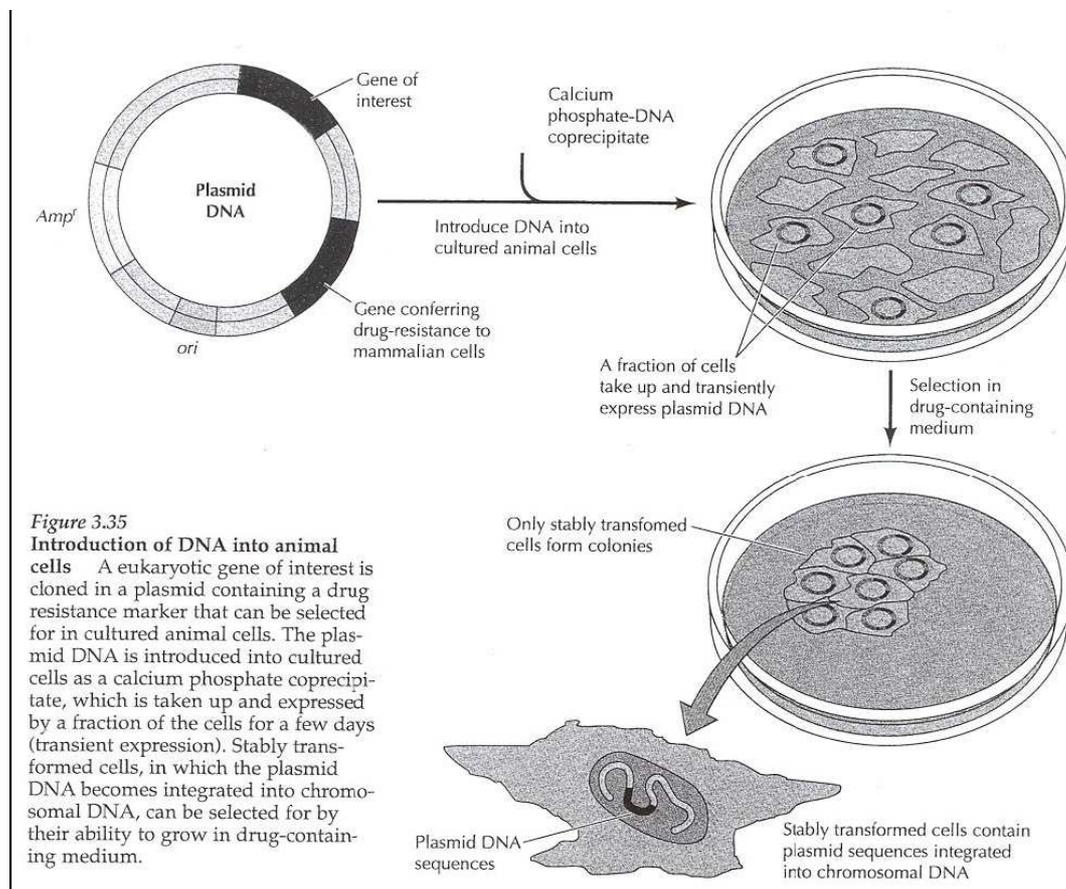
**Purificación de las proteínas recombinantes** tras la lisis de los microorganismos. Normalmente la proteína de interés constituirá entre un 1 y 10% de la proteína total, y la purificación se puede conseguir fácilmente en unas cuantas etapas. Un proceso similar al descrito se utiliza para producir insulina humana recombinante, utilizada rutinariamente en la clínica, a gran escala en la bacteria *Escherichia Coli*.

## **4.6.- MANIPULACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS Y ORGANISMOS ANIMALES**

La expresión de proteínas eucariotas que presentan un procesamiento posttranscripcional complejo no puede realizarse en bacterias, siendo necesaria su expresión en células u organismos animales.

### 4.6.1. Manipulación genética de células eucariotas

El proceso seguido es similar en su planteamiento general al descrito en el apartado anterior. En primer lugar, es necesario clonar la región codificante del gen que se quiere expresar, para obtener cantidad suficiente de ADN. El proceso de clonación suele hacerse en bacterias, ya que su manejo es mucho más rápido y sencillo que el de las células eucariotas. Este ADNc se introduce en un vector de expresión para células eucariotas que contiene una región promotora que puede ser reconocida por la ARN polimerasa II eucariota. Muchas veces se utilizan promotores inducibles, o específicos de tejido, y también promotores virales que originan una tasa de expresión muy elevada. El vector contiene también genes que permiten su selección tanto en la amplificación en bacterias como en las células eucariotas.



Expresión de proteínas exógenas en células eucariotas. En el esquema siguiente se observa la estructura de un vector de expresión típico con la región Ori (origen de replicación en bacterias), un gen de selección AmpR que permite su selección en la amplificación en bacterias al conferir resistencia al antibiótico ampicilina, otro gen de selección a ciertos fármacos que permite la selección de las células eucariotas que han aceptado el plásmido, y por último el gen de interés que se quiere clonar. El plásmido, tras ser amplificado en bacterias (este paso no aparece en el esquema), se

introduce en las células eucariotas que posteriormente se someten al tratamiento con una droga tóxica. Sólo las células que han integrado el plásmido son capaces de sobrevivir a este tratamiento porque contienen un gen de selección que lo permite. En algunos casos el ADN se integra en el ADN cromosómico y las células están transformadas de forma estable. El cultivo en un medio adecuado permitirá la producción de la proteína terapéutica cuyo ADNc se ha introducido.

Los plásmidos son amplificados en bacterias, por esto también contienen las secuencias que permiten la unión de la ADN polimerasa (Ori). El ADN clonado y amplificado en bacterias se purifica y se introduce en células eucariotas en cultivo (figura 1). Existen numerosas técnicas que garantizan este proceso, denominado transfección. Entre ellas están la co-precipitación con fosfato cálcico, o la utilización de liposomas, que facilitan la endocitosis de los plásmidos por la célula; también se emplea electroporación, así como virus animales, ya que son muy eficaces para la introducción de material genético. Éstos se analizarán con más detalle en el capítulo de terapia génica.

El gen quimérico que contiene el ADNc de interés puede introducirse en las células dentro del plásmido original, o bien se puede liberar de éste cortando con enzimas de restricción, para introducirlo como un fragmento de ADN lineal. El ADN foráneo una vez en el interior de la célula puede insertarse en los cromosomas o puede mantenerse como un episoma. En el primer caso, si la célula se divide el ADN se replicará con el ADN endógeno, y se transmitirá a cada una de las células hijas, hablamos entonces de transfección estable. En el segundo caso, el ADN se puede replicar extracromosómicamente (si contiene un origen de replicación) pero puede no segregarse a todas las células hijas, dando lugar a una expresión transitoria. La proteína expresada se purifica del resto de proteínas tras la lisis de las células.

#### **4.6.2. Manipulación genética de organismos animales**

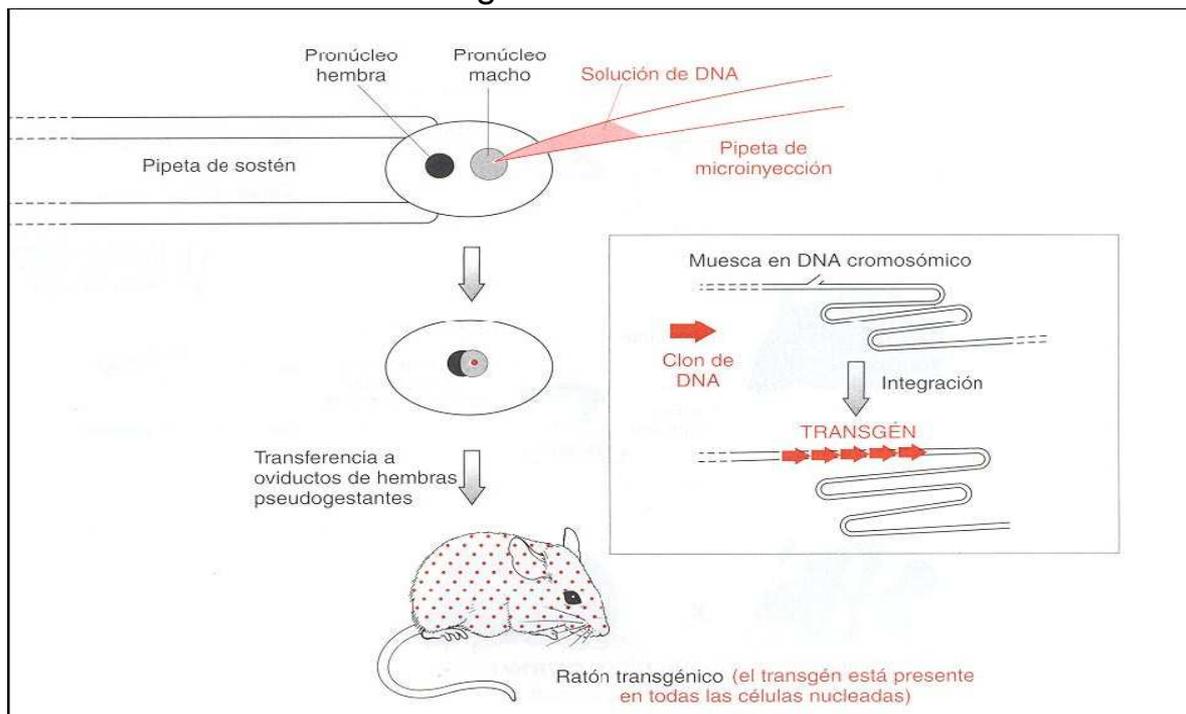
Los genes clonados de interés se pueden introducir en células animales totipotentes, capaces de dar lugar a las células diferenciadas de un animal adulto (pueden ser oocitos fecundados o células madre embrionarias). Estas células totipotentes modificadas genéticamente son capaces de contribuir al desarrollo de animales completos, obteniéndose así animales transgénicos que expresan las proteínas deseadas en todas sus células o de manera específica en algún tejido.

Aunque el ratón de laboratorio ha sido el animal preferido para los estudios de transgénesis, son los animales de granja (ovejas, cabras y vacas) los principales candidatos para la producción de proteínas exógenas a escala industrial. Las regiones codificantes de las proteínas de interés se unen normalmente a promotores de genes que se expresan de manera

específica en un tejido, por ejemplo en la glándula mamaria, en el caso del gen de la b-lactoglobulina. De esta forma se consigue que el la proteína deseado sea segregada en la leche, un fluido fácilmente accesible desde el que se puede purificar la proteína, para por ejemplo su posterior uso clínico. Para construir un animal completamente transgénico (en el que todas las células nucleadas contengan el ADN de interés insertado) se pueden adoptar dos estrategias generales. Una de ellas implica la integración al azar del ADN exógeno en el and cromosómico de un oocito fecundado. La segunda implica la integración del ADN en una fase post-zigótica, empleando células embrionarias totipotentes (ES). Este último procedimiento genera animales parcialmente transgénicos, pero siempre y cuando una proporción razonable de las células germinales contenga el ADN introducido, los animales fundadores pueden cruzarse hasta consolidar la línea, obteniendo descendientes completamente transgénicos. Los dos métodos más utilizados para obtener animales transgénicos se describen a continuación.

### Microinyección de pronúcleos

Para obtener animales transgénicos por esta vía se provoca la sobre-ovulación de las hembras, que son apareadas con machos fértiles. Al día siguiente, los oocitos fecundados se recogen de los oviductos. Una vez obtenidos los oocitos fecundados, se microinyecta el ADN de interés al pronúcleo masculino utilizando un micromanipulador (figura 2). Los oocitos que sobreviven a la inyección se reimplantan en los oviductos de madres adoptivas y se permite su desarrollo hasta animales maduros. Durante el procedimiento, el ADN microinyectado (el transgén) se integra al azar en el ADN cromosómico, casi siempre en un único sitio, a pesar de que a veces se han detectado dos sitios de integración en un mismo animal. Los sitios



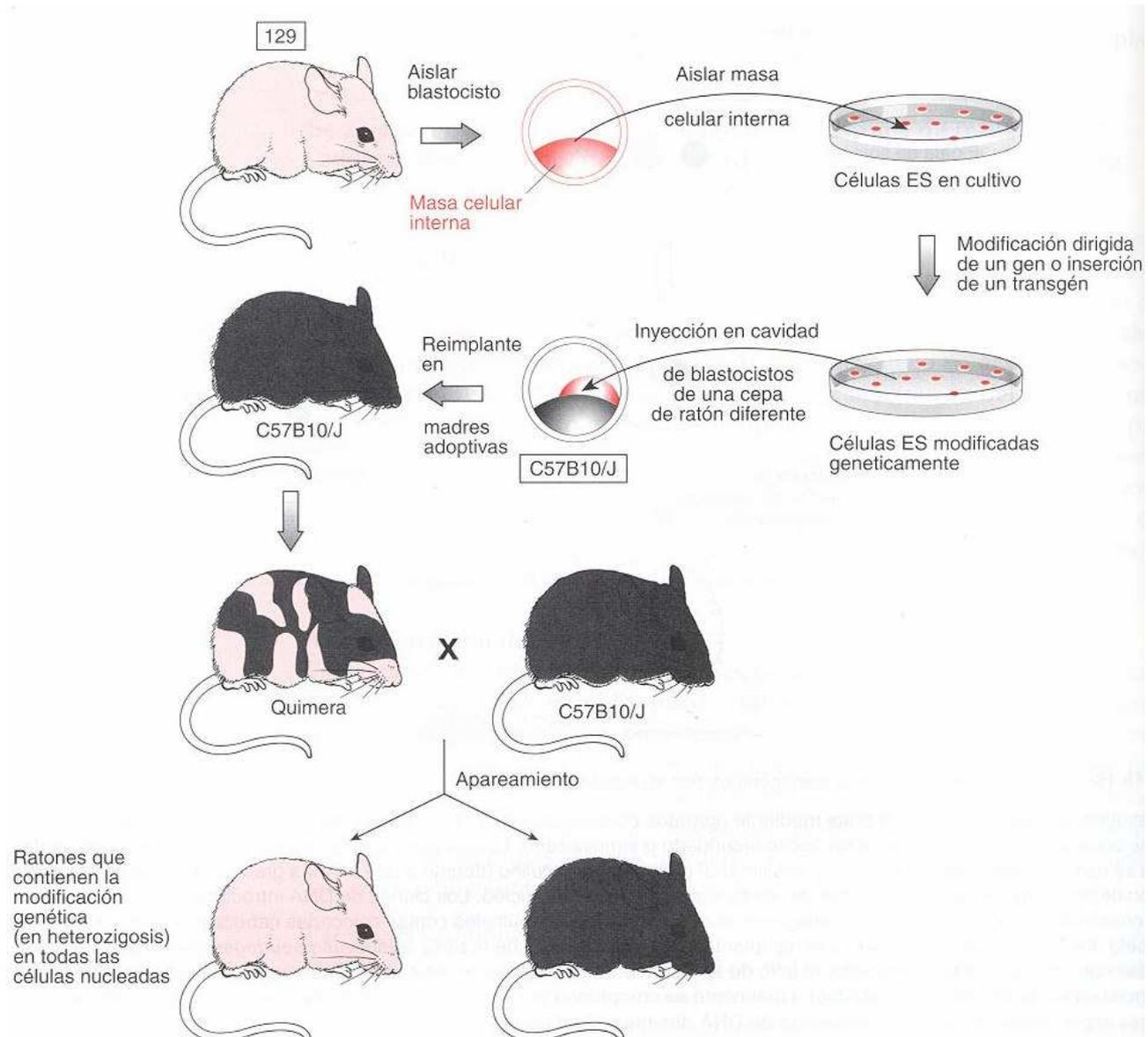
**Construcción de ratones transgénicos por inyección en el pronúcleo masculino.** Se utilizan dos micropipetas de vidrio: una de ellas, la de sostén, tiene permite inmovilizar a un oocito fecundado mediante la aplicación de una ligera succión. La otra pipeta, la de microinyección, tiene una punta muy fina permite llegar al pronúcleo masculino (mayor que el femenino), para inyectar una solución acuosa del ADN deseado. El ADN introducido se puede integrar en el ADN cromosómico, lo que da lugar a transgenes que suelen contener múltiples copias colocadas cabeza con cola. Los oocitos que sobreviven después de este proceso son reimplantados a los oviductos de madres adoptivas pseudogestantes (que han sido apareadas con un macho vasectomizado; ya que el coito permite iniciar los cambios fisiológicos en la hembra que estimularán el desarrollo de los embriones implantados). Finalmente se comprueba por PCR si los ratones resultantes del desarrollo de los embriones implantados contienen el trasgen inyectado (Fig. 19.16 de Strachan y Read, *Genética Molecular Humana*, 1999).

de integración pueden contener múltiples copias de los transgenes, integrados en los cromosomas como encadenados cabeza-cola (no es inusual encontrar 50 o más copias en un mismo sitio de inserción). Como consecuencia de la integración en el cromosoma, los transgenes pueden ser transmitidos a las generaciones siguientes siguiendo un patrón mendeliano.

### **Inyección en blastocistos de células madre embrionarias genéticamente modificadas**

La microinyección de ADN foráneo en oocitos fecundados es técnicamente difícil y no es adecuada para la producción a gran escala de animales transgénicos o para realizar manipulaciones genéticas sofisticadas. Una alternativa frecuentemente utilizada consiste en transferir el ADN foráneo a células embrionarias totipotentes (ES). Estas células se obtienen de la masa celular interna del blastocisto de embriones tempranos. Las células ES pueden ser cultivadas in vitro, y son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, cuando se reubican en un blastocisto huésped y se reimplantan en una madre pseudogestante. El embrión que se desarrolla recibe se denomina de quimera\* ya que contiene dos poblaciones de células derivadas de cigotos diferentes: las células del blastocisto, y las células ES implantadas. Si las dos líneas de células derivan de ratones con pelaje de color diferente, la descendencia quimérica puede ser fácilmente identificada. El empleo de células ES genéticamente modificadas da lugar a ratones parcialmente transgénicos. Debido a que las células ES inyectadas pueden originar toda o a parte de la línea germinal de la quimera (en los casos menos favorables pueden no contribuir a la formación de la línea germinal, cosa que no es infrecuente). A partir de los ratones nacidos parcialmente

transgénicos (fundadores) se puede obtener ratones completamente transgénicos. Para ello se cruzan un ratón quimérico con otro de pelaje de color recesivo respecto del de la cepa de células ES que se ha utilizado y se examina la descendencia.



Creación de animales transgénicos por introducción de células ES modificadas genéticamente a blastocistos. Las células de la masa celular interna del blastocisto se cultivaron tras la escisión de los oviductos y el aislamiento de blastocistos a partir de una cepa de ratón adecuada (cepa 129). Estas células madre embrionarias (ES, por embryonic stem cells) retienen la capacidad de diferenciarse, en última instancia, en los diferentes tejidos adultos del ratón. Las células ES pueden ser genéticamente modificadas en cultivo, admitiendo la inserción de ADN foráneo o la introducción de mutaciones sutiles. Una vez modificadas, las células ES pueden ser inyectadas en blastocistos aislados de otra cepa de ratón (por ejemplo, C57131 O/J, que posee un pelaje negro recesivo respecto del color marrón de la cepa 129), y estos blastocistos,

por su parte, pueden ser implantados en madres adoptivas pseudo gestantes de la misma cepa que el blastocisto. El posterior desarrollo del blastocisto introducido produce ratones quiméricos, que contienen dos poblaciones de células (incluyendo las células germinales) que derivan de cigotos diferentes. Esto se hace patente por el pelaje no uniforme, con manchas de colores derivados de una u otra cepa. Los retrocruzamientos de las quimeras con las cepas progenitoras y los posteriores apareamientos consanguíneos pueden producir ratones que son heterocigotos u homocigotos para la modificación genética.

## **Manipulación dirigida de genes en animales**

Este proceso denominado en inglés gene targeting permite mutar un gen determinado previamente seleccionado. Esta mutación puede producir la inactivación del gen, en cuyo caso hablamos de mutación knock-out, o cualquier otro tipo de cambio. Por tanto los animales portadores de una mutación knock-out en un gen determinado se denominan a su vez knock-out. La manipulación dirigida de genes se basa en la recombinación homóloga. Básicamente el procedimiento consiste en introducir en una célula embrionaria totipotente el gen portador de la mutación que queremos provocar, para que mediante recombinación homóloga sustituya al gen normal. Posteriormente se seleccionan las células en las que ha ocurrido la recombinación. Estas células son implantadas en blastocistos del animal correspondiente, generalmente ratón, los cuales una vez implantados en una madre adoptiva darán lugar a ratones que contienen la mutación.

La recombinación homóloga es un fenómeno muy raro en células de mamífero, y precisa que las secuencias implicadas en la recombinación sean altamente homólogas. Para facilitar la detección de las células que han sufrido la integración del transgen, se utilizan genes marcadores. Uno de ellos confiere resistencia a neomicina, gen neo. De esta forma el gen que se desea introducir se incorpora a un vector que entre otras características presenta el gen neo. Existen dos tipos principales de vectores: de inserción y de sustitución. Los primeros modifican el locus seleccionado mediante una única recombinación. Los vectores de sustitución permiten reemplazar parte de la secuencia del gen seleccionado por la que nosotros hemos modificado, mediante dos fenómenos de recombinación o mediante conversión génica.

Los ratones knock-out permiten obtener modelos de enfermedades genéticas humanas recesivas. Sin embargo en muchas ocasiones el fenotipo resultante de un ratón knock-out es normal, como consecuencia de mecanismos de redundancia genética que suplen la carencia del gen mutado.

En ocasiones la inactivación de un gen en todas las células de un animal ocasiona la muerte de este en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Para evitar este problema se puede inactivar la expresión del gen en determinadas células del animal.

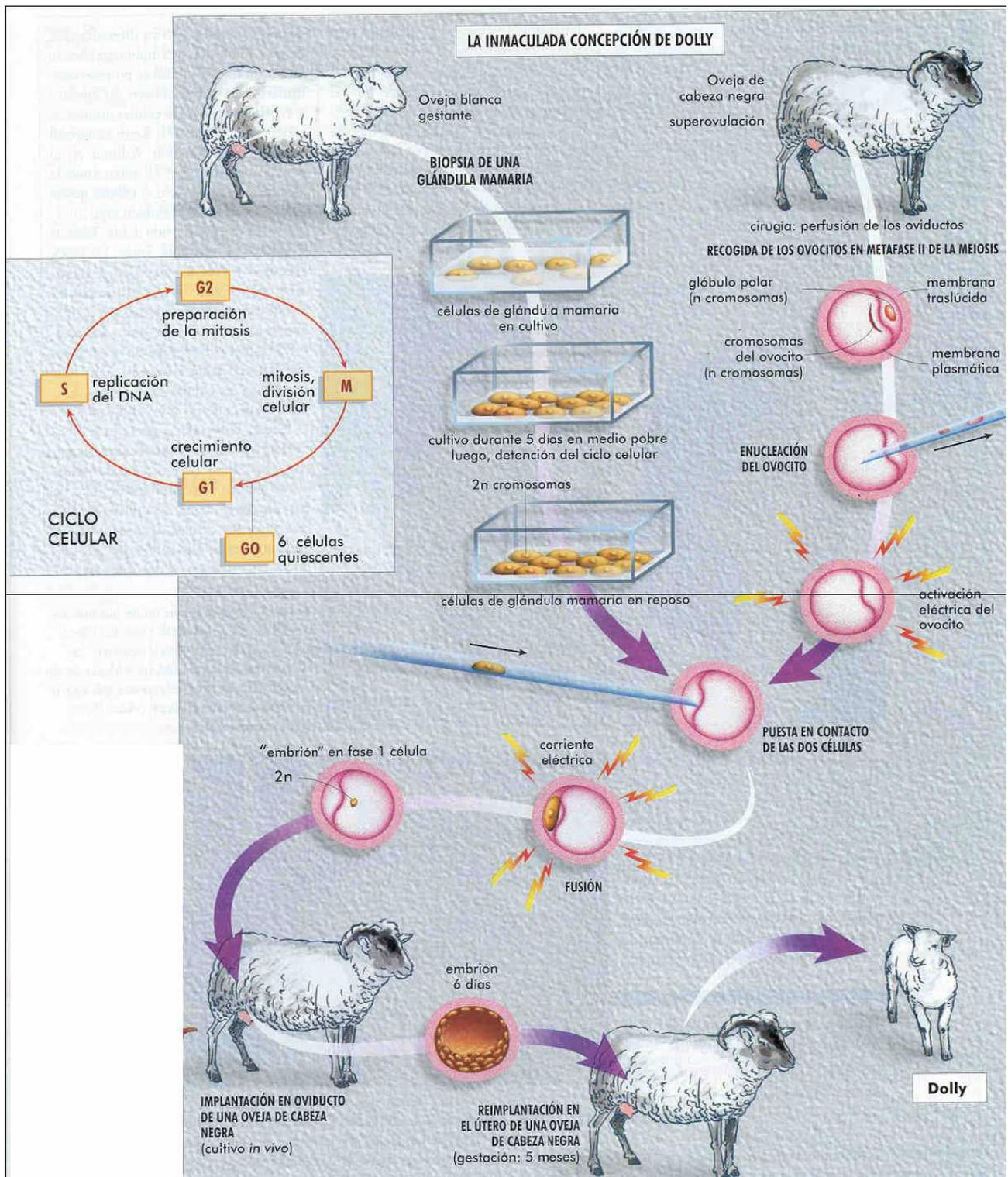
## Obtención de animales clónicos

La clonación de animales se basa en la transferencia nuclear. La transferencia nuclear requiere el concurso de dos células:

La **célula receptora** del núcleo suele ser un óvulo sin fecundar y reciente. Esos óvulos están listos para empezar a desarrollarse en cuanto reciben el estímulo apropiado.

La **célula donante** del núcleo es una célula del organismo que se quiere copiar. Bajo un microscopio potente, se mantiene fijo mediante succión el óvulo receptor en el extremo de una pipeta, y con una micropipeta muy fina se absorben los cromosomas (en esa etapa los cromosomas están bien definidos y no hay membrana nuclear). Luego la célula donante, con su núcleo desarrollado, se fusiona con el óvulo receptor.

Algunas células fusionadas empiezan a desarrollarse como un embrión normal y producen descendencia si se implantan en el útero de una madre de alquiler.



Clonación de animales a partir de células diferenciadas. El ejemplo que se muestra corresponde a la estrategia seguida en la clonación de la oveja Dolly, una oveja blanca. La célula donadora del núcleo procedía de la glándula mamaria de una oveja blanca de la que es clónica Dolly. Estas células de glándula mamaria se mantuvieron en cultivo en condiciones adecuadas para que estuvieran en fase G<sub>0</sub> el ciclo celular. El óvulo receptor del núcleo pertenecía a una oveja de otra raza con la cara negra. La elección de las células donadoras y receptoras de núcleo de diferentes razas permite apreciar rápidamente la participación de cada una en el nuevo ser clónico, que es

idéntico al individuo que proporcionó el núcleo celular. La estrategia detallada del proceso se puede seguir en el dibujo.

En los experimentos en los que la célula donante del núcleo procede de un cultivo celular, se adoptan medidas especiales para hacer compatible ésta con la célula receptora (siempre un óvulo). De forma especial es importante coordinar los ciclos de replicación del ADN y los de producción de ARN mensajero. Normalmente se opta por utilizar células donantes cuyo ADN no se está replicando en el momento de la transferencia. Para ello, se trabaja con células que son obligadas a permanecer inactivas mediante reducción de la concentración de nutrientes en el cultivo. Después de la transferencia nuclear, se aplica al óvulo híbrido pulsos de corriente eléctrica para inducir la estimulación que, en condiciones normales, proporciona el espermatozoide.

Se han obtenido muchos animales clónicos hasta el momento (ratones, conejos, ranas, vacas, ovejas y monos), en la mayoría de los casos las células donadoras de núcleos son células embrionarias; sin embargo, se han podido clonar animales a partir de células adultas totalmente diferenciadas. La oveja Dolly fue el primer animal obtenido según esta última estrategia .

La posibilidad de obtener individuos clónicos a partir de células en cultivo abre las puertas a la manipulación genética de las células donantes de núcleos, permitiendo la obtención de animales transgénicos que además son clónicos. Éstos pueden, por ejemplo, producir proteínas humanas de importancia clínica. Ya se ha visto anteriormente la técnica habitual para obtener animales transgénicos requiere la microinyección de una construcción génica (una secuencia de ADN que incorpora el gen deseado) en un buen número de huevos fecundados. Frente a ello, la clonación de animales a partir de núcleos de células en cultivo permitiría de una forma más rápida la obtención de rebaños de animales de granja transgénicos totalmente homogéneos para la producción de proteínas con interés farmacológico. Esta técnica se está desarrollando actualmente en varios centros de investigación.

#### **4.7.- AGENTES TERAPÉUTICOS Y VACUNAS**

Una vez que se ha caracterizado el gen responsable de una enfermedad, es posible utilizar las herramientas de la genética molecular para determinar su función y explorar los procesos biológicos implicados en los estados normal y patológico. La información obtenida puede utilizarse para diseñar nuevas terapias empleando estrategias convencionales basadas en la administración de fármacos o nuevas basadas en la capacidad de clonar genes individuales, transferirlos a células receptoras y expresarlos; de diseñar nuevas proteínas; y de inhibir específicamente la expresión de determinados genes. Estas nuevas estrategias terapéuticas pueden dividirse en dos grupos generales, dependiendo de si el agente terapéutico es un

producto génico (proteína)/vacuna, o bien se trata del propio material genético: en el primer caso se trata de los fármacos y vacunas recombinantes y en el segundo de la terapia génica propiamente dicha.

1. **Fármacos y vacunas recombinantes** obtenidos por ingeniería genética. Podemos distinguir los siguientes tipos:

a) **Productos génicos normales** expresados en sistemas celulares heterólogos adecuados para producir grandes cantidades de proteínas médicamente valiosas.

b) **Anticuerpos manipulados por ingeniería genética**. Los genes de los anticuerpos pueden manipularse para formar nuevos anticuerpos, incluyendo anticuerpos parcial o completamente humanizados, para su uso como nuevos agentes terapéuticos.

c) **Vacunas obtenidas por ingeniería genética**. Nuevas vacunas contra el cáncer y vacunas contra agentes infecciosos.

2. **Terapia génica**. Utiliza directamente los ácidos nucleicos como agentes terapéuticos.

#### **4.7.1. Expresión de productos génicos normales en sistemas heterólogos**

Muchas patologías humanas necesitan la administración exógena de proteínas que no pueden ser expresadas por el propio organismo. Por ejemplo, las personas diabéticas necesitan el suministro continuado de insulina, y los hemofílicos de Factor VIII de la coagulación. Estos compuestos se han obtenido tradicionalmente de animales (insulina) cuando la secuencia de aminoácidos era suficientemente próxima como para no provocar respuestas inmunes, o bien de sangre de donantes o de cadáveres. Estos procesos además de extraordinariamente caros ofrecen múltiples problemas que se comentarán posteriormente.

Una vez que se ha clonado un gen humano, se puede obtener una gran cantidad de producto génico recurriendo a sistemas adecuados de clonación por expresión. Esto suele implicar la expresión del gen de interés en células bacterianas, que tienen la ventaja de que pueden cultivarse en grandes volúmenes, con lo que permiten la obtención de gran cantidad de producto. Incluso cuando se dispone de tratamientos consolidados, la estrategia basada en la expresión en sistemas heterólogos disminuye el riesgo de transmitir enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los diabéticos habían sido tratados tradicionalmente con insulina extraída de vacas o cerdos. Sin embargo, debido a la diferencia de secuencia de aminoácidos entre los productos de estos animales y la insulina humana, estos productos resultan potencialmente inmunogénicos y pueden producir efectos secundarios no deseados en individuos muy inmunorreactivos.

La administración de productos humanos purificados bioquímicamente también tiene sus riesgos. Recientemente, muchos

hemofílicos han desarrollado SIDA como consecuencia del tratamiento con factor VIII purificado a partir del suero de donantes humanos que no habían sido cribados para la presencia del virus. La deficiencia en hormona del crecimiento se trataba habitualmente con hormona del crecimiento humana purificada. Sin embargo, algunos pacientes desarrollaban la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (un raro trastorno neurológico que es el equivalente humano del scrapie de las ovejas y de la enfermedad de las vacas locas) debido a que la hormona había sido extraída de un gran número de pituitarias de cadáveres humanos.

La insulina recombinante humana fue comercializada por primera vez en 1982, y posteriormente se han comercializado otros muchos productos de interés médico obtenidos a partir de genes humanos clonados.

Cuando la proteína terapéutica precisa determinado procesamiento para ser activa, que solo sucede en células eucariotas (glicosilación por ejemplo) se debe recurrir a la expresión en organismos hospedadores adecuados, tales como levaduras, células de mamíferos, etc. Cada vez se está prestando mayor atención a la construcción de animales de granja transgénicos, cuyos sistemas de modificación post-traduccionales son más parecidos a los sistemas humanos. Por ejemplo, un gen humano clonado puede fusionarse a un gen de oveja que especifique una proteína de la leche, y luego ser insertado en la línea germinal de la oveja. La oveja transgénica resultante puede secretar grandes cantidades de la proteína de fusión a la leche.

#### **4.7.2. Anticuerpos manipulados por ingeniería genética**

La clonación de los genes de las inmunoglobulinas humanas, permite diseñar combinaciones artificiales de los segmentos de los genes de las inmunoglobulinas, dando lugar a la denominada ingeniería de anticuerpos. Los diferentes dominios de una molécula de anticuerpo vienen codificados en exones distintos, por lo que el intercambio de dominios puede realizarse fácilmente en el ADN, recurriendo al barajado de exones entre genes de anticuerpos diferentes.

#### **Anticuerpos humanizados**

Uno de los objetivos iniciales de la ingeniería de anticuerpos fue la producción de anticuerpos de roedor humanizados, es decir, anticuerpos recombinantes entre roedores y humanos. Este proceso permite utilizar la gran cantidad de anticuerpos monoclonales de ratón con fines terapéuticos, incluyendo los específicos contra antígenos humanos que son difíciles de obtener en una respuesta inmune humana.

Las primeras versiones de estos anticuerpos contenían los dominios variables de un anticuerpo de roedor, unidos a los dominios constantes de un anticuerpo humano.

Como resultado la inmunogenicidad de los anticuerpos

monoclonales de roedor se reduce al ser empleados en seres humanos y al tiempo, los lugares de unión al antígeno pueden seleccionarse para su aplicación terapéutica eficaz.

Se han conseguido anticuerpos humanizados de segunda generación que contienen únicamente las regiones hipervariables (CDR: los lazos de unión al antígeno) de los anticuerpos monoclonales murinos. Ambos tipos de anticuerpos humanizados han sido construidos contra una amplia gama de patógenos microbianos y marcadores de superficie de células humanas, incluyendo antígenos tumorales. En algunos casos estos han sido utilizados en terapia génica.

**Tabla 20.2:** Ejemplos del potencial clínico de los anticuerpos humanizados

Diana	Potencial clínico
CDw52	Linfomas, vasculitis sistémica, artritis reumatoide
CD3	Trasplante de órganos
CD4	Trasplante de órganos, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn
Receptor de IL-2	Leucemias y linfomas, trasplantes de órganos, enfermedad de rechazo del trasplante
TNF- $\alpha$	Shock séptico
HIV	SIDA
RSV	Infección vírica respiratoria sincitial
HSV	Infección por herpes neonatal, ocular y genital
Lewis-Y	Cáncer
p185 <sup>HER2</sup>	Cáncer
PLAP	Cáncer
CEA	Cáncer

TNF, factor necrosante de tumores; HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; RSV, virus del sarcoma de Rous; HSV, virus herpes simple; p185<sup>HER2</sup>, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; PLAP, fosfatasa alcalina placentaria; CEA, antígeno carcinoembrionario. Derivado de Winter y Harris (1993).

## Anticuerpos humanos

Se han adoptado dos estrategias para la construcción de anticuerpos totalmente humanos. Los anticuerpos recombinantes se pueden producir in vitro, expresándolos en fagos y después hacer la selección imitando las estrategias de selección del sistema inmune.

Una segunda estrategia reciente ha sido el empleo de ratones transgénicos que expresan única y específicamente inmunoglobulinas humanas. Esta estrategia implica la transferencia a las células madre embrionarias del ratón de los loci humanos de las cadenas pesada y ligera kappa de inmunoglobulinas. Los ratones transgénicos que se obtienen producen un repertorio diverso de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas. Cruzando estos ratones con ratones que están manipulados genéticamente para ser deficientes en la producción de inmunoglobulinas de ratón, se obtuvo una cepa de ratones con elevada producción de anticuerpos, la mayoría de los cuales estaban compuestos por cadenas pesadas y ligeras de origen humano. Estas cepas deberían permitir

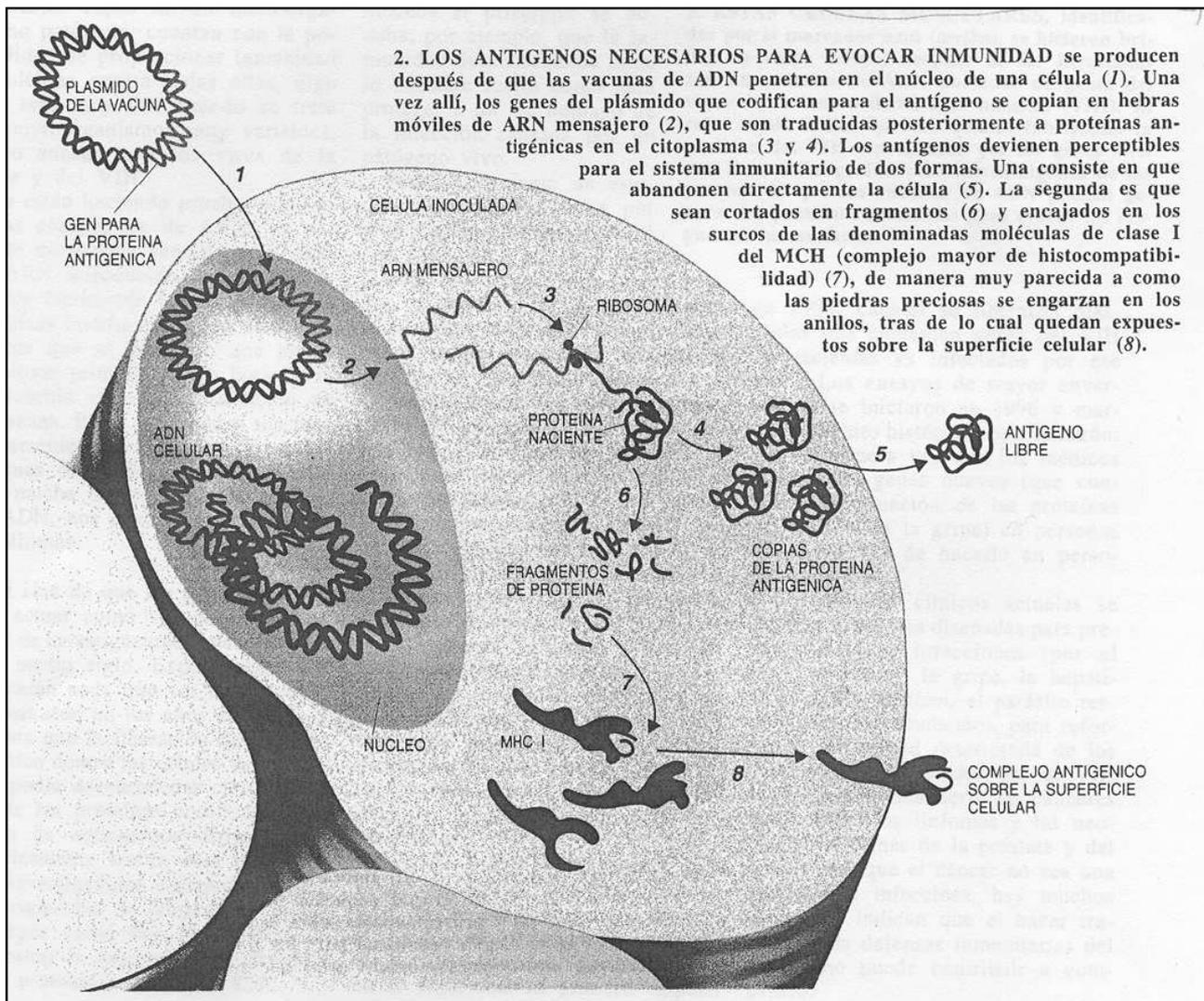
el desarrollo de anticuerpos monoclonales totalmente humanos con potencial terapéutico.

### **4.7.3. Vacunas obtenidas por ingeniería genética**

Las vacunas constituyen el mayor logro de la medicina moderna. Se ha logrado la protección frente a muchas enfermedades con las vacunas clásicas. Sin embargo, hay muchas enfermedades para las cuales no se logra una protección eficaz, bien porque los métodos clásicos de inmunización no son eficaces, o porque comportan riesgos excesivos. La inmunización clásica se logra inoculando antígenos aislados de patógenos, o bien patógenos muertos o atenuados. Este último método es el más eficaz porque desencadena una respuesta doble del sistema inmune: una respuesta humoral de producción de anticuerpos y una respuesta celular por la activación de células citotóxicas. Esta doble respuesta garantiza una memoria a largo plazo del sistema inmune y por lo tanto una protección permanente frente a ese patógeno. La tecnología del ADN recombinante está siendo aplicada a la construcción de nuevas vacunas que garanticen la protección a largo plazo gracias al desarrollo de la doble respuesta inmunitaria humoral y celular, evitando los riesgos de las vacunas vivas ya que aquí no se inoculan microorganismos sino fragmentos de ADN que codifican antígenos de esos microorganismos. También se está utilizando esta estrategia para obtener vacunas contra ciertos tipos de tumores.

Se están aplicando diversas estrategias:

1. **Inyección directa del ADN.** Los fragmentos de ADN alcanzan el interior de las células y llegan al núcleo donde se transcriben y traducen originando antígenos que pueden salir al exterior como antígenos libres y desencadenar la respuesta inmunitaria humoral, o bien pueden ser degradados parcialmente dentro de la célula que los presenta en su superficie (en esta presentación participan las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad), y desencadenar una respuesta celular mucho más duradera. La inyección directa de un fragmento del ADN del virus de la gripe (conservada entre las diferentes cepas del virus) en células musculares del ratón ha resultado en una potente respuesta inhibitoria contra la gripe. Si esta estrategia funciona de forma tan eficaz en humanos, el potencial terapéutico es muy considerable.



Mecanismo de acción de las vacunas obtenidas por inyección directa de ADN.

2.- **Modificación genética del antígeno.** Estas modificaciones buscan aumentar su inmunogenicidad, lo que puede lograrse, por ejemplo, fusionando genes de los antígenos con el gen de una citocina. Las citocinas son sustancias solubles activadoras del sistema inmune.

3.- **Modificación genética de microorganismos patógenos.** A su vez puede emplear dos estrategias:

a) **Inactivar genéticamente un organismo** (por ejemplo, eliminando los genes necesarios para su patogénesis o supervivencia). Este es un método genético de atenuación, de manera que se puede usar una vacuna viva sin riesgo innecesario.

b) **Insertar un gen exógeno** que será expresado en bacterias o parásitos. Una aplicación prometedora es el empleo del bacilo Calmette Guérin (BCG), genéticamente modificado, como vehículo para la inmunización. El BCG es un bacilo de tuberculosis atenuado utilizado como vacuna, de hecho es la vacuna más utilizada en el mundo. Este bacilo es per se inmunomodulador, y tiene una incidencia de complicaciones serias muy baja. Se han desarrollado cepas recombinantes de BCG con vectores de

expresión que contienen secuencias reguladoras del bacilo acopladas a genes que codifican antígenos foráneos. Estas cepas pueden provocar la síntesis de anticuerpos de larga vida, así como respuesta mediada por células contra antígenos foráneos en ratón. Mantienen el potencial de expresar varios antígenos simultáneamente, por lo que podrían emplearse para la expresión de múltiples antígenos protectores contra diferentes patógenos. Los organismos recombinantes de este tipo pueden emplearse no sólo como portadores de genes de agentes infecciosos, sino también de tumores (vacunas anticancerosas), y teóricamente de autoantígenos.

## 4.- CONCLUSIONES

La ingeniería genética tiene un gran potencial. Por ejemplo, el gen para la insulina, que por lo general sólo se encuentra en los animales superiores, se puede ahora introducir en células bacterianas mediante un plásmido o vector. Después la bacteria puede reproducirse en grandes cantidades constituyendo una fuente abundante de la llamada insulina recombinante a un precio relativamente bajo. La producción de insulina recombinante no depende del, en ocasiones, variable suministro de tejido pancreático animal. Otros usos de la ingeniería genética son el aumento de la resistencia de los cultivos a enfermedades, la producción de compuestos farmacéuticos en la leche de los animales, la elaboración de vacunas, y la alteración de las características del ganado.

Desde que el 27 de febrero de 1997 anunciara el Instituto Roslin de Edimburgo el nacimiento de la oveja Dolly (por clonación partiendo del núcleo de una célula adulta éxito trascendente del investigador Ian Wilmut), se ha creado un temor ante la posibilidad de que la clonación animal pudiera extenderse a la especie humana, miedo que este momento adquiere amplias proporciones, miedo global. Estos episodios se producen como consecuencia del singular desarrollo de las biotecnologías, el desarrollo científico y técnico y se produce de forma asombrosa a partir del siglo XIX, llamado "siglo de las luces", en el que se dieron a conocer descubrimientos impresionantes en orden no sólo a episodios médicos: cirugía, anestesiología, inmunología, así como a las leyes y principios de Mendel por los que se rige la transmisión de caracteres heredados; mientras que de otra parte, se acaba de publicar la clasificación de las especies por parte de Darwin. Estas investigaciones junto con el desarrollo de la Física, la Química y las Matemáticas crean una preocupación en el hombre de Ciencia que aspira a conseguir "el conocimiento definitivo" o lo que se llamó también "soberano de las cosas" (A. Ran). Como consecuencia se puso en marcha el método experimental para someter a aquellas verdades al referido método, a fin de comprobar lo que eran simplemente hipótesis, los hechos que pasaban a ser tesis y finalmente doctrina en orden a su aplicación práctica. Sin embargo, este planteamiento no tuvo resultados definitivos, puesto que pasamos al siglo XX con una enorme duda en lo político, social, económico, científico, técnico y en todas las ramas del saber y del pensar; al punto que se vive una singular zozobra -duda- que afecta a toda la sociedad, pero particularmente a la juventud que, actualmente, está también experimentando esta situación.

La última parte del siglo se caracteriza por el gran desarrollo de las biotecnologías, macro y micro biotecnologías. Las macrobiotecnologías habían comenzado hace tiempo, en el año 1789 con la puesta en práctica de la inseminación artificial por el Abate italiano Lazzaro Spallanzani. La

inseminación artificial se va a difundir de una manera extraordinaria en la especie animal, consiguiendo un desarrollo magnífico en la mejora de las especies animales y en la producción de las mismas, circunstancia que ha contribuido a la enorme producción de alimentos de alto valor biológico (leche, carne, huevos, etc.) que han contribuido decididamente al desarrollo físico, mental e intelectual del hombre. Dos años después la inseminación artificial ganadera suscita interés en la medicina y un médico de Lyon pone en práctica esta técnica, circunstancia que provoca una enorme impresión desde el punto de vista ético, moral, religioso, social, etc. El Autor de estas primeras investigaciones fue procesado por tribunales civiles y también sancionado por la Santa Sede. La inseminación artificial en la especie humana ha tenido sin embargo un desarrollo extraordinario (niños de diseño), hoy es perfectamente conocida la existencia de centros de reproducción, inseminación, etc., que –normalmente- deberían utilizarse simplemente para resolver problemas de esterilidad, si bien las cosas son bien distintas.

En el año 1974, comienza a realizarse la fecundación in vitro, es decir la puesta en contacto en el exterior del organismo de gametos masculinos y femeninos (ovocito y espermatozoide), generando de esta manera un blastocisto que en definitiva es una vida en marcha, aunque incipiente –pero vida, sin embargo-. Dos años más tarde (1976) nace la denominada "primera niña probeta", conseguida como método de tratamiento de la esterilidad de la Sra. Lesley, que decide por consejo de los especialistas médicos realizar la fecundación in vitro, trasplantar el blastocisto al útero preparado de la señora (receptora estéril) resolviendo así el problema y dando lugar al nacimiento de la niña Lesley Braun, que tendrá ahora 26 años -episodio que se lleva a cabo con absoluta normalidad-.

El nacimiento de la niña probeta plantea un verdadero problema social, ético, moral, y sobre todo una gran preocupación respecto al planteamiento ético-religioso, al extremo de que el Cardenal Ratzinger (1983), con la autorización y consejo del Santo Padre, publica la "Instrucción sobre Bioética" (22-2-1983) , que el obispo de Valenzuela comunicó a los españoles en Enero –día de San Pedro- del referido año. La Instrucción no es un documento- Dogma de Fesino simplemente en este caso se trata de una orientación - normas orientativas- de interés para los creyentes y no creyentes en orden al desarrollo de las biotecnologías en reproducción. Este Documento no fue bien aceptado por los Prelados franceses que plantearon serios problemas; en definitiva el documento no es un "NO" al desarrollo científico y técnico en materia de reproducción sino simplemente es un "SI" a la preservación de la dignidad humana frente al poder del hombre mismo como consecuencia de los avances científicos y técnicos. Es la defensa sencillamente de los valores humanos. El hombre no es "algo" -sino alguien-, no es un conjunto de órganos y tejidos, es un ser trascendente; cualquiera

que sea el concepto que se tenga del propio ser humano, el hecho repugna a los valores ostenta el propio ser humano respecto a la dignidad y trascendencia. Estos valores -dignidad- van en contraposición a que la vida humana pueda ser generada en un tubo de ensayo y en tal caso, habría que discutir de quién es esa vida humana: ¿del fabricante de la misma? Esto plantearía un interrogante seriamente preocupante. En estas circunstancias la referida Instrucción se pronuncia en contra de la inseminación artificial heteróloga (con material fecundante distinto al del marido), sin embargo admite la fecundación o inseminación homóloga cuando se trata de una terapia médica para salvar los problemas de esterilidad, considerando muy seria la preocupación de aquellos matrimonios que desean tener hijos. Igualmente se admite la investigación para mejorar los índices de fertilidad, fecundidad y prolificidad en el humano, así como el diagnóstico precoz de la gestación y cuantos avances vayan a favor del éxito procreativo y no alteren los valores y la dignidad del propio ser humano.

El anuncio de la clonación exitosa en la especie animal (nacimiento de la oveja Dolly, junio de 1996, anunciado el 27 de febrero de 1997), representa una enorme preocupación respecto a la posibilidad de que la clonación pueda ser puesta en práctica en la especie humana creando una verdadera polémica entre los abortistas -partidarios de esta técnica como método de reproducción y sobre todo de terapia- y los antiabortistas representados por la Asociación Internacional Pro Vida.

En el momento actual existe cierto enfrentamiento (basta observar la lucha entre los partidarios de los mismos, y la potente asociación internacional pro-vida, opuesta a esta tesis, entre planteamientos éticos, morales y religiosos con los avances de la ciencia y la tecnología (aplicación de la misma).

Se han obtenido córneas en el laboratorio trabajando con células embrionarias del área episcleral, que una vez desarrolladas mediante técnicas modernas de impulso de crecimiento (hormonas somatotróficas), permiten utilizar las mismas en trasplante de la córnea dañada. La sangre del cordón umbilical se utiliza actualmente para obtener células madre capaces de regenerar (hematopoyesis, leucocitos, hematíes y plaquetas), así como otras células neuropoyéticas de gran interés para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, etc. Las perspectivas modernas de terapia de las enfermedades cardíacas apuntan al empleo de cardiomiocitos (células madre que inyectadas al tejido cardíaco serían capaces de regenerarlo).

La conclusión es que sin descartar -es urgente una reglamentación internacional a la investigación sobre el cultivo de células madre y respecto a los blastocistos existentes en los bancos respectivos-, la investigación ofrece

un enorme campo pudiendo eludir la destrucción de blastocitos (seres vivos en desarrollo), que debería fomentarse evitando así los planteamientos encontrados a que antes nos referíamos.

La tecnología moderna de clonación ha tenido que resolver temas muy importantes: en primer lugar la fecundación del ovocito para conseguir el óvulo fecundado; en segundo lugar la obtención de las células procedentes del individuo adulto y de un tejido lo más favorable posible -para el ulterior desarrollo- al trasplante (células procedentes del tejido epitelial, especialmente fibroplastos, o procedentes de glándulas en desarrollo como consecuencia de situaciones gestacionales -tal como ocurrió con la oveja Dolly cuyas células procedían de la glándula mamaria-). En todo caso los fracasos fueron inicialmente alarmantes, el gran descubrimiento de I. Wilmut fue el plantear que para que el desarrollo ulterior se produzca tras el trasplante del núcleo al óvulo fecundado pero enucleado era la desprogramación de las células adultas a fin de retrasar su reloj biológico para volverlas a cero, desintonizando de esta manera con los impulsos del desarrollo del ovocito al que iban a ser trasplantadas.

Una modificación técnica muy importante (1983) de Mc. Grath y Solter fue el transplante del contenido total de la célula, es decir de lo que se llamó "masa celular interna" (MCI), simplificando notablemente el proceso. En todo caso, se llegó a la conclusión de que para poner en marcha el proceso divisional una vez hecho el transplante nuclear al ovocito (enucleado) era muy importante el empleo de activadores; en este sentido se pusieron en práctica diferentes tecnologías tales como la aplicación del virus Senda; inactivado que favorecería la fusión de estos elementos, así como la utilización del Arginato sódico, la Promoza, el Polietilenglicón, luz ultravioleta, estímulos eléctricos y finalmente la Telomerasa (fermento protector de los telómeros que ponen en marcha la actividad de los cromosomas en función a su estado de desarrollo e integridad). En todo caso, existía un gran pesimismo en orden a las posibilidades de la clonación en mamíferos superiores, de tal manera que en el año 1984 Mc. Grath y Solter llegaron a manifestar "la clonación en mamíferos superiores es imposible, puesto que se necesita la "impronta genética" que tiene lugar cuando funciona un genoma de origen materno y paterno".

Como resumen podemos significar que la clonación en la especie animal ha tenido por objeto la mejora ganadera, basada en intereses económicos (de productividad), de tal manera que la empresa PPL Therapeutics en principio, se planteó este tema, sin embargo en el curso de las investigaciones se dieron cuenta que se podía llegar más lejos y a partir de ella conseguir otros resultados. Por tanto la clonación en la especie animal ha tenido -en principioel objetivo de la clonación reproductiva. Como es sabido, el anuncio del nacimiento de la oveja Dolly se produce seis meses

después de ocurrido aquél -tiempo que se dedicó al establecimiento jurídico de las patentes que se deducían del mismo y, no sólo de este hecho, sino de las perspectivas de obtención de medicamentos a través de animales clónicos obtenidos posteriormente por clonación-. En este episodio participó fundamentalmente la empresa GERON que es la que en la actualidad posee mayor número de patentes al respecto, así como la empresa PPL Therapeutics y la Red Neuron, entre otras; empresas sometidas a grandes presiones capitalistas empeñadas en participar en las perspectivas económicas de futuro que pueden deducirse y que se han cifrado en varios miles de millones a partir del año 2002. Los responsables de grandes laboratorios de investigación como Richard Seed (EEUU), Avelino Antinori (Italia), Setsum (Japón), representan las intenciones más activas en orden a conseguir la clonación en la especie humana. Con razón el rotativo Financia; Times (1998) anunciaba: 7a medicina entra en la ciencia-ficción, con perspectivas económicas impensables a través de la clonación terapéutica y el uso de las células madre (embrionarias stem cells) ".

A primeros de noviembre (2001) la Empresa Immerge Biotherapeutics (Universidad de Missouri) anunció la obtención de cinco cerditos clonados, con modificación en el genoma, consistente en suprimir (desactivar) un gen; precisamente el responsable del rechazo, que desde el punto de vista bioquímico es el determinante desde la superficie celular (molécula galaetosil transferasa -A-1,31), azúcar que el sistema inmunológico del receptor reconoce como extraño, generando el rechazo.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

- **T. Strachan & A.P. Read. Genética molecular humana.** Ed. Omega 1999, “Terapia génica y otras estrategias terapéuticas basadas en genética molecular”. Capítulo 20.
- Investigación y ciencia:
  - Avances en terapia génica. Agosto 1997.
  - Mundo Científico:
    - Una nueva frontera para la investigación médica. Febrero 1999.
- • **Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique.** 3ª edición, (1994) R.I. Freshney. Editorial Wiley-Liss.
- Investigación y Ciencia. **El futuro de la ingeniería de tejidos.** Junio 1999.
- Mundo científico. **¿Células aptas para todo?** Julio-Agosto 1999.
- Science. **Lab-Grown Organs Begin to Take Shape.** D Ferber (1999) vol.284 (pág. 422-425).
- Science. **Tissue engineerig: From the lab to the Clinic.** D. Ferber (1999) Vol 284 (pág.423).
- Science. **Embrionic Stem Cell Lines derived from Human Blastocysts.** J.A. Thomson y cols. (1998) vol 282 (pág. 1145-1147).
- Science. **Functional Arteries Grown in Vitro.** L.E. Niklason y cols. (1999) vol 284 (pág. 489-493).
- Nature Neuroscience. **PEDF is a niche signal for adult neural stem cell selfrenewal.** C. Ramirez y cols. (2006).
- Strachan T. and Read A.P. **Genética molecular humana.** Ediciones Omega 1999. Capítulo 19.  
Estructura y función de los genes humanos.
- **Investigación y Ciencia:**  
Producción de fármacos a través de animales transgénicos. Marzo 1997.  
Clonación con fines médicos. Febrero 1999.  
Vacunas genéticas. Septiembre 1999.