

TERÀPIA GÈNICA:

Trenquem la bombolla



The bubbles

“No hay gen para el espíritu humano.”

Jerome Eugene Morrow

ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	3
INTRODUCCIÓ	5
OBJECTIUS I HIPÒTESI.....	7
ASPECTES TEÒRICS.....	8
1. RESUM I CONCEPTES BÀSICS	9
1.1. Els àcids nucleics.....	9
1.2. Herència	10
1.3. El sistema hematopoètic	11
1.4. Els limfòcits.....	13
2. DEFICIÈNCIA DE L'ENZIM ADA (ADA-SCID).....	15
2.1. Adenosina-desaminasa.....	15
2.1.1. Estructura	16
2.1.2. Expressió	17
2.1.3. Funcions	17
2.2. Causes i herència	19
2.3. Altres tipus de síndromes de la immunodeficiència combinada severa	21
2.3.1. Deficiència de la cadena gamma comuna de limfòcits T	21
2.3.2. Deficiència de Cinasa Janus 3	21
2.3.3. Deficiència de la cadena alfa del receptor IL-7	21
2.3.4 Síndrome Omenn.....	22
2.4. Síntomes	23
2.5. Tractament	24
2.5.1. Història.....	24
2.5.2. Trasplantament de medul·la òssia	25
2.5.3. Enzim ADA amb solució PEG.....	27
2.5.4. Teràpia Gènica.....	27

3. TERÀPIA GÈNICA.....	28
3.1. Rerefons històric.....	28
3.2. Tipus de teràpia gènica.....	30
3.3. Vectors.....	31
3.3.1. Vector viral.....	32
3.3.2 Vectors no virals.....	34
3.3.3. Vectors híbrids.....	35
3.4. Procediment.....	37
3.5. Cèl·lules diana.....	38
3.6. Aplicacions.....	39
3.6.1. Càncer.....	39
3.6.2. Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS).....	40
 PART EXPERIMENTAL.....	 41
4. PRÀCTICA: Modificació genètica de cèl·lules de llevat.....	42
4.1. Objectiu i hipòtesi.....	42
4.2. Material.....	43
4.3. Metodologia.....	44
4.4. Resultats.....	52
4.5. Conclusions.....	54
 5. ENTREVISTES A ESPECIALISTES.....	 55
5.1. Cristina Fillat.....	55
5.2. Miguel Chillon.....	62
5.3. Jordi Barquinero.....	73
5.4. Conclusions.....	83
 6. CONCLUSIONS.....	 84
 7. BIBLIOGRAFIA.....	 89
 ANNEXES.....	 92

AGRAÏMENTS

Voldríem agrair a diverses persones que han ajudat que aquest treball sigui possible:

- En primer lloc, volem donar-li les gràcies a la nostra tutora pel seguiment i els consells que ens ha donat en relació al treball. Així com, agrair-li la llibertat que ens ha proporcionat alhora d'estructurar i elaborar el projecte després dels molts canvis d'opinió sobre el tema a triar.
- Continuant pel Francesc Posas, catedràtic de la Universitat Pompeu Fabra, pel gran suport i les múltiples idees que ens va donar, que ens han ajudat a realitzar la part experimental. També agrair-li la confiança que va dipositar en nosaltres alhora de deixar-nos utilitzar els seus laboratoris i el material necessari per realitzar l'experiment.
- A Santiago Cavero per ensenyar-nos tot el que cal saber sobre els laboratoris de recerca en biomedicina i així poder dur a terme la part experimental del treball en la que va tenir un paper molt important.
- Al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona per deixar-nos utilitzar les seves instal·lacions i donar-nos l'oportunitat d'assistir a una conferència sobre una investigació que es duia a terme en el departament en el qual vam treballar.
- A Miguel Chillón, científic responsable de la Unitat de Producció de Vectors del CBATEG, pel temps invertit en la nostra entrevista i per la dedicació alhora de respondre'ns les preguntes, cosa que ens va fer gaudir de l'explicació i ens va proporcionar molta informació per acabar desenvolupant unes conclusions més completes i objectives.
- A Jordi Barquinero, doctor del Institut de Recerca Vall d'Hebron, per deixar-se entrevistar i ajudar-nos a trobar una resposta al problema que ens plantejàvem a l'inici del treball. A Cristina Fillat per respondre també a les nostres preguntes i dedicar-nos el seu temps.

- Finalment, no podíem deixar de donar-li les gràcies a la nostra professora de biologia de 1er de Batxillerat. En primer lloc, per fer-nos estimar la biologia i les branques que abasta i donar-nos les bases durant tot el curs sobre com realitzar un bon treball. Així com oferir-nos la seva desinteressada ajuda, donant-nos consells i proporcionant-nos contactes.

INTRODUCCIÓ

Segur que alguna vegada hem sentit a parlar dels nens bombolla, però, qui són? Per què es diuen així? Realment viuen en una bombolla de plàstic? Quina malaltia els afecta i quina importància té? Hi ha un tractament definitiu per a ells?

Els nens bombolla són uns infants que pateixen el síndrome de la immunodeficiència combinada greu que ve provocat per la deficiència d'un enzim, l'ADA. L'absència d'aquest enzim provoca l'acumulació de productes tòxics metabòlics dins dels limfòcits que acaba provocant la mort de la cèl·lula. Aquest fet comporta l'aparició de diverses infeccions els primers dies de vida. Aquesta malaltia, també anomenada SCID per les seves sigles en anglès (*Severe Combined Immune Deficiency*), és un trastorn autosòmic recessiu. Aquest tipus de SCID pot acabar amb la mort dels pacients abans dels dos anys d'edat per infecció massiva. Aproximadament 1 de cada 100.000 nens neix amb aquesta malaltia. Antigament quan no existia una cura per a ells, aquests nens els aïllaven dins unes bombolles de plàstic esterilitzades d'on no en podien sortir ja que hi havia el risc que agafessin infeccions.

Amb els anys s'han anat trobant diferents tractaments, alguns dels quals han donat molts bons resultats. El trasplantament de medul·la òssia és de moment la primera línia de tractament per a aquest síndrome, tot i que n'hi ha d'altres però no tan eficients. La teràpia gènica és un tractament innovador per a aquesta malaltia, que pot tornar el somriure a aquests nens. Consisteix en la modificació dels gens de les cèl·lules defectuoses per curar el trastorn genètic.

El nostre treball de recerca parla sobre la teràpia gènica aplicada al síndrome de la immunodeficiència combinada greu provocat per la deficiència de l'ADA. També hem decidit incloure un apartat d'ètica, ja que aquest tema pot generar controvèrsia. Dins aquesta part, hem inclòs els resultats d'unes enquestes per saber l'opinió pública.

La nostra font d'informació ha estat principalment Internet, tot i que també hem consultat llibres, articles, i hem fet entrevistes a especialistes en teràpia gènica i en immunodeficiències.

El nostre treball l'hem organitzat de manera que en un inici hem determinat

uns objectius i hem plantejat una hipòtesi. A la part teòrica del treball hem inclòs uns conceptes generals sobre el tema i tota la informació sobre el SCID i la teràpia gènica. La part pràctica l'hem dividida en dues parts: una d'elles la vam fer al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona que consisteix en la modificació genètica d'unes cèl·lules, i l'altre consisteix en entrevistes a professionals. Finalment hem desenvolupat les nostres pròpies conclusions sobre l'objectiu que cercàvem. Als annexes hem inclòs l'apartat d'ètica, ja que és un tema que no està relacionat directament amb la idea principal del treball, però que tot i així hem trobat molt interessant, i per aquest motiu l'hem posat als annexes

Per poder fer l'experiment de la part pràctica vam contactar amb un conegut, en Francesc Posas, catedràtic de la Universitat Pompeu Fabra, que treballa al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. En un primer moment ens va aconsellar sobre el tema del treball, ens va donar diverses idees i ens va mostrar les instal·lacions del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Fruït d'aquesta primera trobada vam preparar la pràctica i ens va proporcionar els recursos necessaris per portar-la a terme. També ens va proporcionar alguns dels contactes que vam utilitzar més endavant per les entrevistes.

Vam contactar amb els professionals entrevistats per correu, que molt amablement van accedir a respondre'ns a les nostres preguntes. Dos d'ells, la Cristina Fillat i el Miguel Chillon, són especialistes en teràpia gènica, i en Jordi Barquinero és doctor del Institut de Recerca Vall d'Hebron, especialitzat en immunodeficiències.

Com hem dit anteriorment, als annexes hem inclòs un apartat d'ètica, on hem realitzat unes enquestes per conèixer l'opinió pública sobre la modificació dels gens. Després de fer el treball, podem agrair a les 284 persones participants que van respondre a les preguntes sincerament i ens van ajudar a arribar a unes conclusions finals.

OBJECTIUS I HIPÒTESI

L'objectiu d'aquest treball és determinar el perquè el síndrome de la immunodeficiència combinada greu és una de les poques malalties que actualment es poden tractar amb teràpia gènica. En els darrers anys hem vist que la teràpia gènica s'ha convertit en una nova línia de tractament per als nens bombolla. Volem investigar perquè aquesta malaltia sí que pot incorporar aquest tractament i unes altres no.

Per resoldre aquest problema buscarem informació tant del síndrome com de la teràpia gènica, per poder aprofundir els nostres coneixements i arribar a unes conclusions el més completes i objectives possibles.

A partir dels coneixements que tenim actualment i sense haver buscat informació, hem plantejat la següent hipòtesi: **si el síndrome de la immunodeficiència combinada greu és una malaltia monogènica, llavors potser es pot tractar amb teràpia gènica.** Pel que sabem en aquests moments, el síndrome de la immunodeficiència combinada greu és una malaltia monogènica, és a dir, que afecta a un sol gen. La teràpia gènica és un tractament que només és viable en aquest tipus de malalties i en el càncer, per tant, no hi hauria d'haver cap problema per poder tractar l'ADA-SCID.

Tot i així, també hi ha malalties monogèniques que no es poden tractar, que no es poden corregir. Quan el gen afecta la formació d'un òrgan o d'un sistema durant el desenvolupament embrionari, un cop neix el nadó la malformació ja hi és present i no pot ser tractada amb teràpia gènica. Aquesta situació és diferent a quan el gen defectuós codifica per una proteïna, ja que tu sempre ets a temps d'introduir-la per algun mitjà al teu organisme.

ASPECTES TEÒRICS

1. RESUM I CONCEPTES BÀSICS

El què és el síndrome de la immunodeficiència combinada severa, què és la teràpia gènica... ho anireu descobrint al llarg d'aquest treball, però ara voldríem definir uns quants conceptes que sortiran de manera repetida o que es donen per sabuts, que han de quedar clars per tal que es puguin entendre bé els procediments.

1.1. Els àcids nucleics

Tots els éssers vius, estan constituïts per cèl·lules. Un organisme format per una única cèl·lula, diem que és unicel·lular, mentre que si està format per un conjunt de cèl·lules és pluricel·lular. Les cèl·lules al mateix temps, estan constituïdes per quatre tipus de molècules: glúcids, lípids, proteïnes i àcids nucleics. Cal destacar els àcids nucleics i les proteïnes pel seu paper important en el tema tractat. Els àcids nucleics són els responsables de l'herència, més concretament, l'àcid desoxiribonucleic (ADN). Totes les cèl·lules d'un únic organisme contenen el mateix ADN, i aquest es va replicant i transmetent a les cèl·lules filles.

L'ADN és una cadena en forma de doble hèlix formada per quatre tipus diferents de nucleòtids: adenina (A), citosina (C), guanina (G) i timina (T). Les dues cadenes d'ADN s'aparellen de tal forma que on en una d'elles hi ha A, en la complementària hi ha T; i on hi ha C, la complementària és G. Les seqüències que formen aquests nucleòtids s'anomenen genoma. La informació que conté el genoma està dividida en gens, i cada gen codifica per una proteïna. Al mateix temps, aquests gens estan agrupats segons la informació que contenen formant cromosomes.

A part de l'ADN, hi ha un altre tipus d'àcid nucleic que és el ribonucleic (ARN). Els diferents tipus d'ARN s'encarreguen de fer la transcripció i la traducció de l'ADN. Trobem el ARN de transferència, el missatger, el ribosòmic i el nucleolar.

1.2. Herència

Al llarg del treball parlarem sobre com s'hereta el síndrome que tractem i per tant, cal conèixer els tipus d'herència. L'herència genètica és el fenomen de transmissió d'un conjunt de caràcters congènits que té un individu d'una determinada espècie. És el pas dels trets que caracteritzen un ésser viu als seus descendents. Qualsevol característica d'un ésser viu que pugui ser transmesa a la seva descendència, l'anomenem caràcter hereditari.

El conjunt de característiques (no visible) que un ésser viu hereta dels seus progenitors s'anomena genotip, i aquelles que es fan visibles en ell s'anomena fenotip; aquest últim ve determinat pel genotip i les condicions ambientals en les que l'ésser s'hi ha desenvolupat. La informació que es transmet es divideix en gens que s'organitzen en cromosomes.

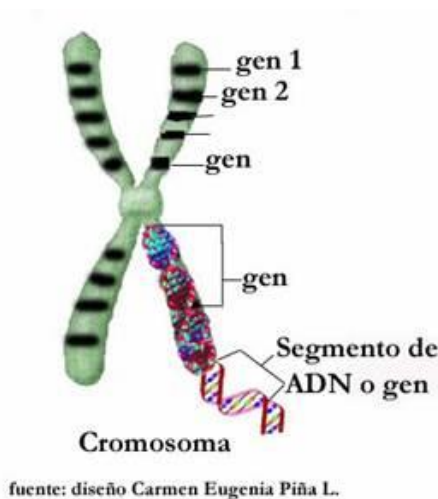


Fig. 1. Estructura d'un cromosoma

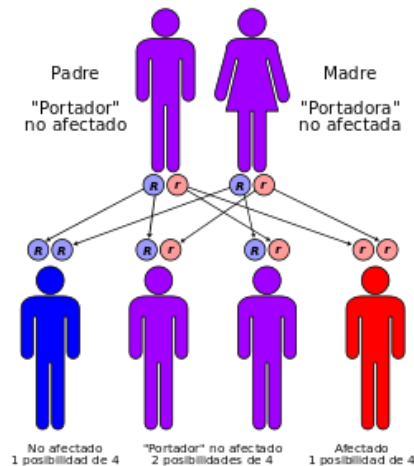


Fig. 2. Patró d'herència

Per parlar doncs dels diferents tipus d'herència, que és el que ens interessa, cal que sapiguem que són els al·lells. Els gens al·lells són dos gens que ocupen el mateix lloc en un parell de cromosomes homòlegs, és a dir, un parell de cromosomes que tinguin la mateixa mida, forma i seqüència de gens, un cromosoma del pare i un de la mare.

Els al·lells poden interaccionar de diverses maneres, i d'aquesta manera parlar sobre l'herència dominant i l'herència recessiva. Si preval un gen sobre l'altre, direm que el primer és dominant sobre el segon, o que el segon és recessiu

respecte el primer. També direm que l'individu és portador de l'al·lel recessiu, ja que el posseeix encara que no el manifesti. El caràcter dominant és sempre visible i oculta al recessiu. El caràcter recessiu pot restar latent durant generacions i manifestar-se quan es donen les condicions de combinació adequades.

En la simbologia genètica, que utilitza lletres per definir un caràcter, les propietats dominants s'escriuen en majúscula i les recessives en minúscula.

A la introducció hem mencionat que el síndrome de la immunodeficiència combinada severa ADA és un trastorn autosòmic recessiu. Amb autosòmic ens referim a que el gen es troba en un dels 22 parells de cromosomes no sexuals, autosomes, podent afectar tant a nens i a nenes. L'al·lel alterat s'ha d'heretar tant del pare com de la mare per tal que el nen pateixi la malaltia.

1.3. El sistema hematopoètic

El sistema hematopoètic (Hema= sang, poètic= producció) és el sistema encarregat de la formació de la sang.

La sang és un teixit líquid, compost per aigua i substàncies orgàniques i inorgàniques (sals minerals) dissoltes, que formen el plasma sanguini i tres tipus d'elements o cèl·lules sanguínies: glòbuls vermells, glòbuls blancs i plaquetes. Per al nostre treball, els qui tindran el paper més important són els glòbuls blancs, dels quals aprofundirem més endavant. Una gota de sang conté al voltant de 5.000 a 10.000 glòbuls blancs.

- **Plasma sanguini:** és líquid i està format per un 90% d'aigua, i la resta són sucres, proteïnes, lípids i sals minerals.
- **Plaquetes:** També anomenades trombòcits, són els corpuscles més petits dels components de la sang, són fragments de cèl·lules i la seva funció és permetre la coagulació. Serveixen per taponar les ferides i evitar, així, les hemorràgies.
- **Glòbuls vermells:** coneguts també com eritròcits o hematies. Són el component més abundant de la sang, i actuen transportant l'oxigen

molecular (O_2) gràcies a l'hemoglobina, un pigment vermell que dona color a la sang. Es sintetitzen en la medul·la vermella d'alguns ossos llargs i la baixa síntesi d'aquests dona lloc a anèmia.

- **Glòbuls blancs:** També anomenats leucòcits, exerceixen la funció de defensar el cos dels microorganismes infecciosos mitjançant mecanismes de neteja (fagòcits) i de defensa (limfòcits). No són tan nombrosos com els glòbuls vermells. Són cèl·lules vives que es traslladen, surten dels capil·lars i es dediquen a destruir els microbis i les cèl·lules mortes que es troben a l'organisme. També produeixen anticossos que neutralitzen els microbis que produeixen malalties infeccioses i es sintetitzen a la medul·la òssia.

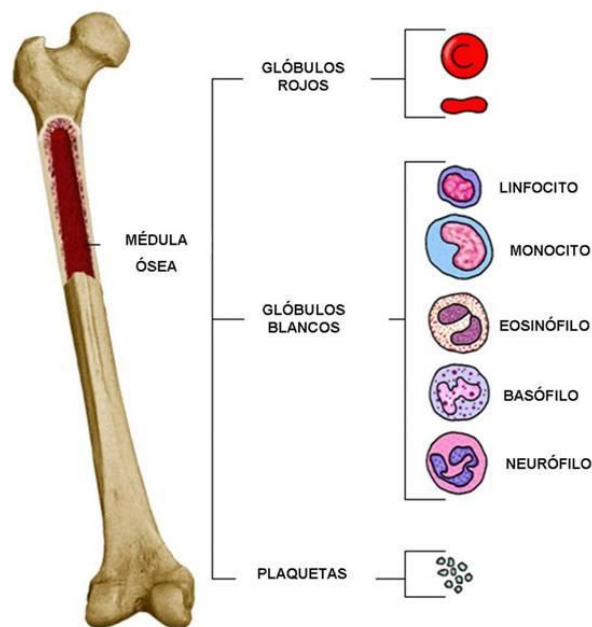


Fig. 3. Components de la sang produïts a la medul·la òssia

Tots aquests compostos que componen la sang es produeixen en la part esponjosa (medul·la) d'alguns ossos de l'esquelet. En la medul·la òssia vermella dels ossos es troben les cèl·lules hematopoètiques pluripotencials, de les que deriven totes les cèl·lules de la sang, això es deu a que són cèl·lules mare.

La sang s'encarrega del transport de nutrients, oxigen, diòxid de carboni i hormones.

1.4. Els limfòcits

De limfòcits, mencionats anteriorment com un tipus de glòbuls blancs, n'hi ha tres tipus:

- **Limfòcits T:** Són cèl·lules centrals en la funció i regulació del sistema immunitari cel·lular dels vertebrats. Són els responsables de coordinar la resposta immune cel·lular, constituint el 70% del total dels limfòcits que segreguen les proteïnes citosines. També s'ocupen de realitzar la cooperació per desenvolupar totes les formes de resposta immune, com la producció d'anticossos pels limfòcits B. Els limfòcits T, que provenen de les cèl·lules mare que s'originen a la medul·la òssia, després passen al tim, on maduraran. És per aquesta raó que se'ls anomena limfòcits T (Tim).
Es diferencien dels limfòcits B i les cèl·lules NK (*Natural killers*), ja que tenen un receptor especial a la superfície de la membrana que els diferencia.
- **Limfòcits B:** són limfòcits que tenen un paper important en la resposta immunitària humoral (en contrast amb la resposta immunitària cel·lular, governada pels limfòcits T). La funció principal dels limfòcits B és fabricar anticossos contra antígens. Els limfòcits B són un component essencial del sistema immunitari adaptatiu.
- **Cèl·lules NK:** són un tipus de limfòcits citotòxics que constitueixen un component principal del sistema immunitari innat. S'anomenen NK de *natural killers* (assassins naturals). Tenen un paper important en el refús de tumors i cèl·lules infectades per virus. Les cèl·lules maten per mitjà de l'alliberament de petits grànuls citoplasmàtics de proteïnes anomenats perforines i granzims, que provoquen que la cèl·lula diana mori per apoptosi o necrosi.

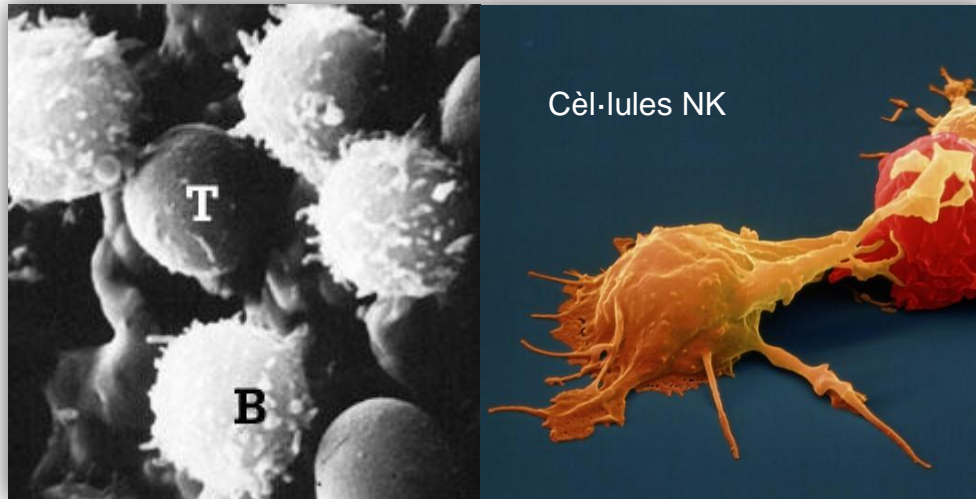


Fig. 4. Visualització 3D dels limfòcits T i B i les cèl·lules NK

2. DEFICIÈNCIA DE L'ENZIM ADA (ADA-SCID)

El síndrome de la immunodeficiència combinada severa és una immunodeficiència primària que es troba dins el grup de les malalties rares. Nosaltres ens hem centrat en un dels tipus que és el que ve provocat per la deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa (ADA). La característica principal és generalment un defecte greu tant en els limfòcits T com en els limfòcits B. Això provoca l'aparició d'una o més infeccions greus en els primers mesos de vida. Aquestes infeccions solen ser greus, i poden fins i tot, ser mortals. Poden incloure la pneumònia, la meningitis o infeccions del corrent sanguini.

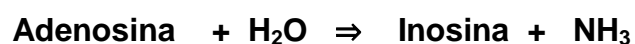
Els nens afectats per el SCID també poden emmalaltir per virus presents en algunes vacunes. Aquestes vacunes (com la varicel·la, el xarampió, el rotavirus, etc) contenen virus i bacteris debilitats que no danyen als nens amb un sistema immune sa. En els pacients amb SCID però, aquests virus i bacteris els hi poden causar greus infeccions mortals. Els nens afectats també creixen més lentament en alguns casos, i alguns tenen retard en el desenvolupament.

La deficiència d'adenosina-desaminasa és un trastorn metabòlic autosòmic recessiu que causa la immunodeficiència. Apareix en menys d'un cada 100.000 nascuts vius en tot el món. **Representa al voltant del 15% de tots els casos d'immunodeficiència combinada severa.** Pot estar present en la infància, l'adolescència o l'edat adulta. L'edat d'inici i la gravetat es relaciona amb uns 29 genotips coneguts associats al trastorn.

Aquesta malaltia provoca la síntesi insuficient de l'enzim adenosina-desaminasa (ADA), que ajuda als limfòcits a defensar l'organisme.

2.1. Adenosina-desaminasa

És un enzim citosòlic i un ectoenzim, és a dir, un enzim adherit a la cara externa de la membrana cel·lular, que intervé en el metabolisme de les purines. Promou la desaminació irreversible de l'adenosina, donant com a resultat inosina, la que pot continuar el seu procés metabòlic transformant-se en hipoxantina.



Intervé en el desenvolupament i manteniment del sistema immune, en la diferenciació de cèl·lules epitelials i en gestació. També participa en els sistemes cel·lulars que involucren els receptors acoblats a les proteïnes G.

L'enzim s'ha trobat en bacteris, plantes, invertebrats, vertebrats i mamífers, amb alta conservació de seqüència d'aminoàcids.

2.1.1. Estructura

El gen ADA produeix un enzim de 363 aminoàcids, i està localitzat al cromosoma 20. El grau de similitud entre les seqüències d'aminoàcids entre espècies és elevat. Aquest enzim es presenta tant en forma de monòmer, com en forma de dímer complex.



Fig. 5. Visualització 3D del monòmer adenosina-desaminasa

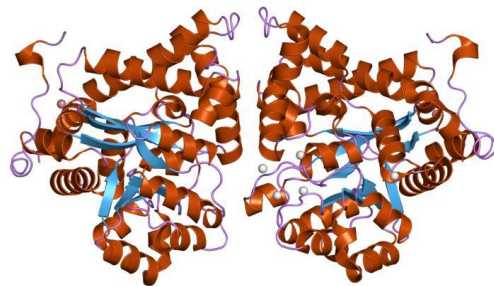


Fig. 6. Visualització 3D del dímer de adenosina-desaminasa

En forma de monòmer l'enzim és una cadena polipeptídica, que envolta un espai central que és el lloc actiu. Aquest espai central conté un ió de zinc coordinat per cinc àtoms i el substrat. El zinc és l'únic cofactor necessari per a l'activitat. El substrat, l'adenosina, s'estabilitza i s'uneix al lloc actiu per nou enllaços d'hidrogen.

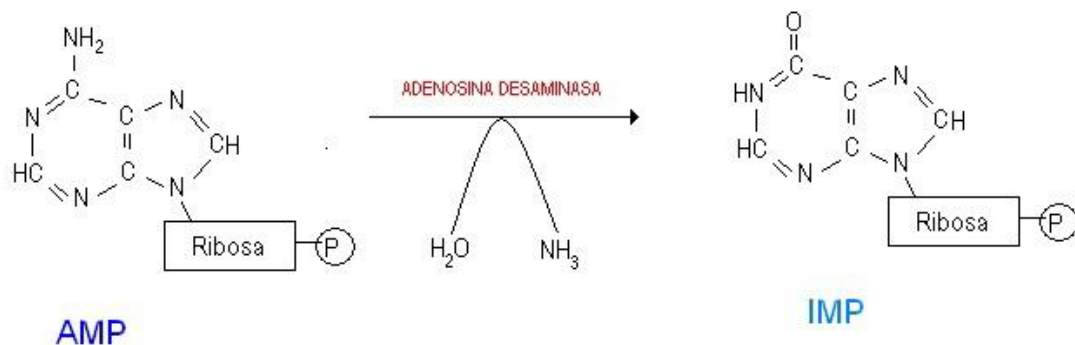
Té una estructura terciària globular. Experiments in vitro han demostrat que si es modifiquen els aminoàcids que actuen amb l'àtom de zinc s'elimina l'efecte de l'enzim.

2.1.2. Expressió

Els llocs on l'activitat del enzim ADA és més elevada depenen de l'espècie, l'activitat de l'enzim varia segons el nivell d'activitat de la cèl·lula. Amb tot, els teixits on s'observa més activitat en gairebé totes les espècies són el duodè i la melsa. En els humans trobem que els llocs on l'activitat del ADA és més elevada és en els teixits limfàtics, especialment al tim, òrgan on maduren els limfòcits T. També trobem una elevada activitat en les vellositats de les cèl·lules epitelials que recobreixen el duodè.

2.1.3. Funcions

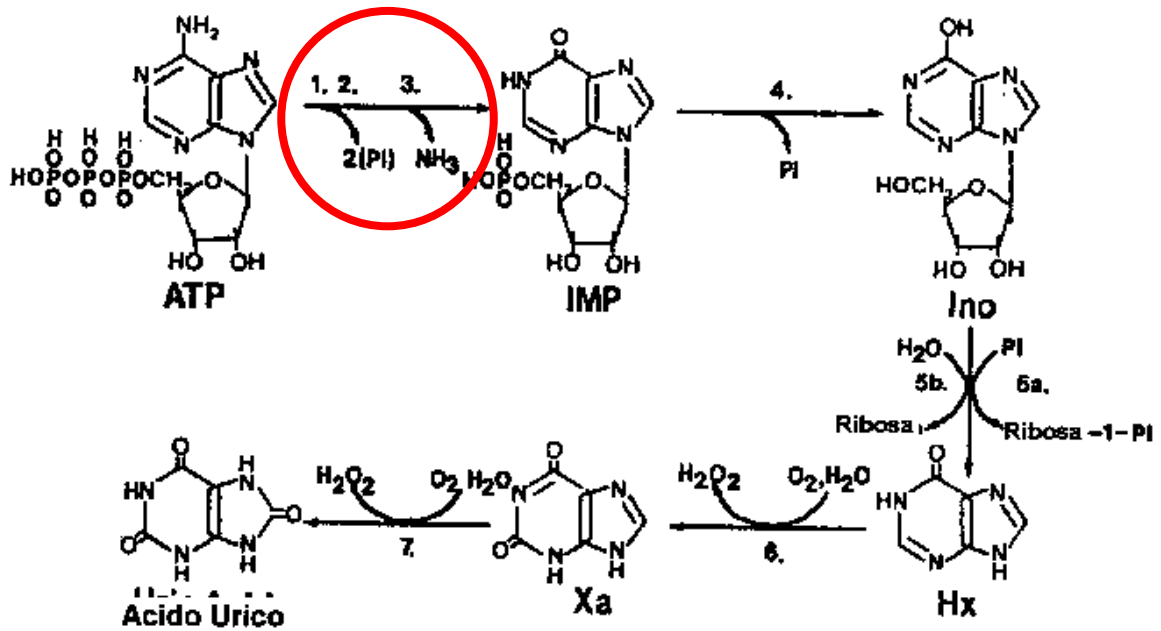
L'ADA citosòlic és un enzim globular que catalitza la hidròlisi de l'adenosina en inosina. Aquesta reacció també es dona amb el substrat desoxiadenosina que té com a producte la desoxiinosina.



L'adenosina-desaminasa actua en la degradació de les purines. Aquesta degradació és especialment important en el fetge i el cervell. La inosina segueix una ruta de degradació fins a convertir-se en urat, que és eliminat amb la urea. Un isoenzim de l'ADA és l'ADAR. L'ADAR és una adenosina-desaminasa específica per l'ARN. Està codificat en el gen ADAR i entre les seves funcions trobem les esmentades a continuació.

L'ADAR bescanvia l'adenosina per inosina en l'ARN de transferència. La inosina és un nucleòsid poc comú que es troba a l'ARN de transferència després que aquest pateixi modificacions en la part final de la seva biosíntesi. Quan

l'adenosina-desaminasa actua sobre l'ARN missatger aquest realitza el mecanisme d'edició, de manera que es canvia el missatge que codifica. En el procés d'edició d'adenosina (A) a inosina (I) el ADAR desamina l'adenina i dona lloc a inosina. Aquestes modificacions alteren les propietats d'aparellament de bases, abans A s'aparellava amb U, ara I, s'aparellarà amb C. Aquesta edició té lloc al nucli abans que l'ARN missatger es processi per complet.



2.2. Causes i herència

Com hem vist fins ara, l'ADA-SCID és provocat per la deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa. La falta d'ADA provoca una acumulació intracel·lular de desoxiadenosina i secundàriament una concentració excessiva de desoxiadenosina-trifosfat (dATP). Aquesta concentració excessiva es fa especialment greu en els limfòcits, ja que aquests no poden eliminar aquest subproducte amb absència d'ADA mentre que altres cèl·lules tenen altres vies per la degradació d'aquest excés.

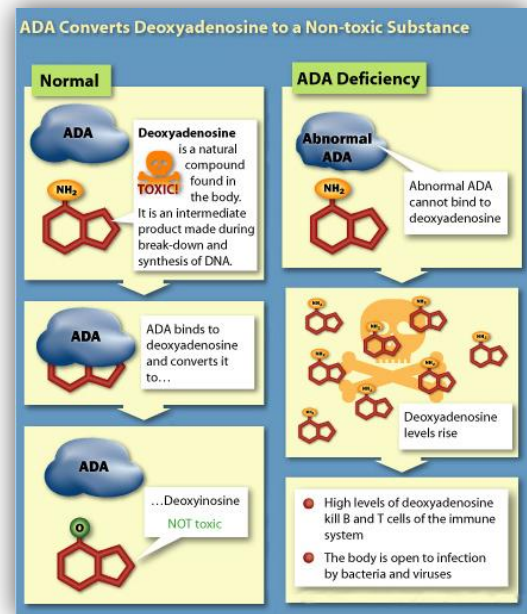


Fig. 7. Representació gràfica de l'activitat de l'adenosina-desaminasa

L'excés de dATP inhibeix un enzim clau per la síntesi de nucleòtids, la ribonucleòtid-reductasa. Aquest fet provoca una deficiència en els nucleòtids que afectarà a la proliferació de limfòcits T. Cal afegir que una de les funcions dels limfòcits T és el control i la col·laboració amb l'activitat dels limfòcits B, de manera que si els limfòcits T es veuen reduïts aleshores també es veu reduïda la producció d'anticossos dels limfòcits B. Això suposa un sistema immune molt debilitat i que qualsevol infecció resulti un problema greu i fins i tot mortal en la salut de l'individu.

Com ja hem mencionat anteriorment l'ADA-SCID s'hereta de forma autosòmica recessiva. Per tant és necessari que els dos pares en siguin portadors o bé la pateixin, és a dir, que els dos pares han de tenir mínim una còpia del gen defectuós. Si només un dels pares té aquesta còpia llavors el fill només en podrà ser portador o no es veurà afectat.

Com que és autosòmica, tant nens com nenes poden patir-la, ja que no està lligada als cromosomes que determinen el sexe.

En la següent imatge es pot veure representat el patró d'herència que té la malaltia de deficiència d'ADA quan els dos pares en són portadors:

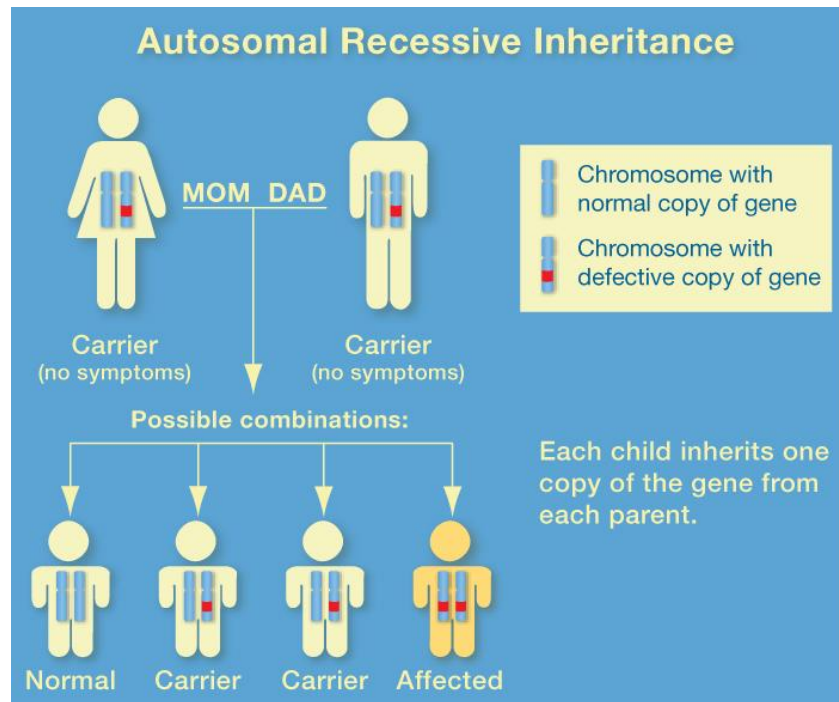


Fig. 8. Patró d'herència autosòmica recessiva

Un 25% dels fills es veurà afectat per la malaltia, mentre que un 50% en serà portador. Només un 25% no es veurà afectat.

2.3. Altres tipus de síndromes de la immunodeficiència combinada severa

2.3.1. Deficiència de la cadena gamma comuna de limfòcits T

Aquesta és la forma més comuna del SCID, que **afecta casi al 45% de tots els casos**. És deguda a mutacions en un gen del cromosoma X (per tant lligada al sexe) que codifica per una cadena proteica de la membrana de les cèl·lules T i NK, en particular, la cadena gamma comuna de la súper família de receptors d'interleucines (citosines). Aquesta cadena és necessària per al creixement normal i la funció dels limfòcits T. Aquesta variant del SCID s'hereta de manera recessiva lligada al cromosoma X, per tant, únicament els homes presenten aquest tipus de SCID tot i que les dones en poden ser portadores. Aquesta mutació provoca un baix nivell de limfòcits T i limfòcits NK, i tot i que el nivell de limfòcits B és normal la seva funció és molt pobre.

Es caracteritza per infeccions greus i recurrents, associades a diarrea i retràs en el creixement. Es manifesta durant els primers mesos de vida amb infeccions virals, bacterianes o fúngiques greus i que normalment amenacen la vida, i retràs en el creixement.

2.3.2. Deficiència de Cinasa Janus 3

Aquest tipus de SCID és provocat per una mutació en un gen del cromosoma 19 que codifica un enzim anomenat Cinasa Janus 3 (Jak3). Aquest enzim és necessari per la funció de la cadena gamma mencionada anteriorment. Els nens que pateixen aquesta variant també tenen un nivell baix de limfòcits T i limfòcits NK, igual que en el SCID lligat al cromosoma X. Tot i així, aquesta forma del SCID s'hereta de manera autosòmica recessiva, per tant, tant nens com nenes poden estar afectats.

La deficiència de Jak3 **representa menys del 10% de tots els casos** del SCID.

2.3.3. Deficiència de la cadena alfa del receptor IL-7

És una forma del SCID deguda a mutacions en un gen del cromosoma 5 que codifica un component d'un altre receptor necessari pel creixement dels

limfòcits T, la cadena alfa del receptor IL-7 (IL-7R α). Els nens que pateixen aquesta immunodeficiència tenen limfòcits B i NK, però no tenen limfòcits T. La falta d'aquest tipus de limfòcits provoca que els limfòcits B siguin inútils. La deficiència de la cadena alfa del receptor IL-7 s'hereta com un caràcter autosòmic recessiu i s'observa en **menys del 5% dels casos de SCID**.

2.3.4 Síndrome Omenn

És degut a mutacions en el cromosoma 11 que codifica enzims necessaris pel desenvolupament dels receptors que reconeixen antígens dels limfòcits T i B. Aquests gens s'anomenen activadors de recombinasa 1 i 2 (RAG1 i RAG2). Els nens amb aquest tipus de SCID no tenen limfòcits T ni limfòcits B, però sí que en tenen de NK. S'hereta com un caràcter autosòmic recessiu.

Finalment, hi ha altres tipus de SCID pels quals encara no s'han identificat els defectes moleculars.

2.4. Síntomes

Els símptomes del SCID generalment apareixen en els primers mesos d'edat, i els pacients normalment es veuen afectats per infeccions bacterianes, virals o fúngiques greus als primers mesos de vida, i sovint es presenten amb malalties pulmonars, diarrea crònica i retard en el desenvolupament. Si aquests nens no es tracten, pel que és general moren en 1 any degut a infeccions recurrents greus, a menys que hagin estat sotmesos a algun tractament amb èxit. Els següents són els símptomes més comuns del SCID. Tot i així, cada nen pot experimentar-los d'una forma diferent. Els símptomes poden incloure:

- Nombroses infeccions que amenacen la vida que no es poden tractar fàcilment i no responen als medicaments (com ho farien els nens que no pateixen d'aquest síndrome) i són de llarga durada, inclouen les següents:
 - Pneumònia – infecció dels pulmons
 - Meningitis – inflamació del cervell
 - Sèpsia – infecció en el corrent sanguini
- Infeccions cròniques de la pell
- Infeccions per fongs en la zona bucal i del bolquer
- Diarrea
- Infecció del fetge
- Pèrdua de pes
- Debilitat
- Escàs creixement
- Algunes infeccions provoquen la mort del pacient, com la verola, el xarampió i el citomegalovirus.

En general els primers símptomes són infeccions respiratòries freqüents i greus com una pneumònia i episodis recurrents de diarrea de causa infecciosa. És molt important que els nens amb ADA-SCID se'ls aïlli de la resta de nens que no pateixen la malaltia o es prenguin precaucions, ja que aquests nens sans podrien ser portadors de malalties com la varicel·la o el xarampió.

2.5. Tractament

Els nens que pateixen d'aquesta malaltia no es poden vacunar amb virus vius, com amb la vacuna de la varicel·la o la triple vírica (xarampió, galteres i rubèola). Donat que no es poden defensar fabricant anticossos, el fet d'introduir un virus a un nen amb SCID, encara que es tracti d'un virus debilitat com els que contenen les vacunes, pot ser molt perillós. Els nens amb SCID només poden rebre transfusions de sang prèviament irradiades per matar glòbuls blancs, ja que, si aquestes cèl·lules estiguessin vives, podrien atacar a l'organisme receptor.

Els pediatres també els poden administrar immunoglobulines per via intravenosa, per ajudar a defensar l'organisme de les infeccions. Tot i així, la primera línia de tractament que hi ha actualment pel SCID és el trasplantament de medul·la òssia.

Al llarg dels anys s'han anat desenvolupant diferents tractaments per solucionar la deficiència de l'enzim ADA. Però abans de veure en què consisteix cada un d'ells veurem una mica d'història sobre la malaltia i els seus tractaments.

2.5.1. Història

Els dos primers trasplantaments de medul·la òssia es van fer a Estat Units l'any **1968**. Un dels pacients tenia el síndrome de Wiskott-Aldrich i l'altre patia un síndrome de la immunodeficiència combinada severa. Tots dos van rebre medul·la de donants que eren idènticament histocompatibles. Va ser l'any **1973** que es va dur a terme el primer trasplantament de medul·la òssia amb èxit en un pacient amb SCID, on el donant era també 100% histocompatible. El pacient va requerir múltiples injeccions de medul·la però finalment es va aconseguir curar-lo.

Entre els anys **1968** i **1973**, els metges ocasionalment eren capaços de diagnosticar un cas de SCID, però, si no hi havia donants histocompatibles no podien corregir el defecte. Desafortunadament, la majoria d'aquests casos no van ser diagnosticats fins que el nen estava greument malalt. El **1971** es va produir una oportunitat inusual. Una mare que havia perdut un fill a causa de la malaltia estava embarassada d'un altre nen. Com que el risc que el nou bebè patís la mateixa malaltia era una possibilitat real, es van fer plans per intentar mantenir aquest nen sa i estalvi fins que el seu sistema immunitari pogués corregir-se. En

David Vetter va néixer el 21 de setembre de 1971 i es va traslladar immediatament en un bressol d'aïllament especialment dissenyat on l'aire es filtrava i tots els elements que entraven al bressol estaven esterilitzats prèviament. Es va comprovar ràpidament que el seu sistema immunològic era defectuós, però no hi havia esperança que la seva germana gran fos un bon donant de medul·la òssia. La resta de la família d'en David es van fer les proves, però cap dels membres era histocompatible i tampoc hi havia registres de donants. En conseqüència, a mesura que creixia també ho feia la bombolla on el noi vivia. Els mitjans de comunicació van narrar una crònica de la seva vida i es va fer conegut arreu del món com "el noi bombolla".



Fig. 9. David Vetter tancat dins la seva bombolla de plàstic



Fig. 10. Pel·lícula inspirada en el cas de David Vetter

No va ser fins a principis dels anys 80 que es va desenvolupar una tècnica per utilitzar la medul·la òssia d'un donant que no era 100% histocompatible. Aquest mètode finalment va fer possible l'ús d'un donant compatible haploidèntic que ha estat i segueix sent el tractament més important per a aquesta malaltia durant les últimes dues dècades.

2.5.2. Trasplantament de medul·la òssia

Aquest tractament consisteix en la introducció de cèl·lules mare de la medul·la òssia a l'organisme del pacient, amb l'esperança que les noves cèl·lules mare niïn i es desenvolupin en l'organisme, permetent així la reconstrucció del sistema immunitari. Per tenir les majors possibilitats d'èxit, els trasplantaments es solen fer utilitzant la medul·la d'un germà. De totes maneres, la medul·la òssia

dels pares també és un recurs acceptable algunes vegades. En els nens que no tenen parents que puguin ser donants, els metges utilitzen donants no relacionats genèticament amb el pacient. Les probabilitats d'èxit amb aquest tipus d'intervenció són majors quan el trasplantament es fa com més aviat millor, durant els primers tres mesos de vida si és possible.

Alguns pacients amb SCID necessiten rebre quimioteràpia abans de sotmetre's al trasplantament, tot i que no és recomanable. La quimioteràpia permet destruir cèl·lules de la medul·la òssia per deixar espai a les cèl·lules donades i per impedir que el sistema immunitari del nen ataqüi a les noves cèl·lules inserides. Hi ha pacients que no necessiten rebre aquest tipus de tractament, sobretot els que tenen molt poques cèl·lules immunitàries. L'ús de la quimioteràpia abans del trasplantament depèn de la gravetat de la immunodeficiència, del tipus de SCID, del donant que s'utilitzi i del centre on es realitzi el trasplantament. En els casos de SCID causats per l'absència d'un enzim, es pot aconseguir que aquest enzim exerceixi la seva funció mitjançant l'administració d'injeccions setmanals que el continguin. No es tracta d'un tractament curatiu sinó pal·liatiu, ja que aquests nens hauran de rebre injeccions de per vida.

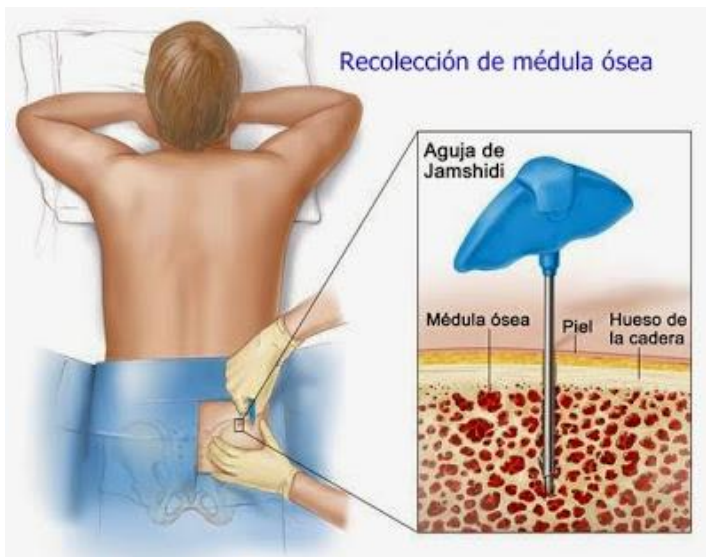


Fig. 11. Mètode d'extracció de medul·la òssia

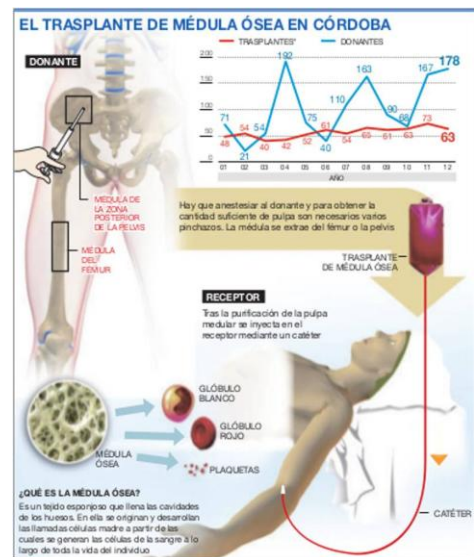


Fig. 12. Procediment que es segueix en un trasplantament

2.5.3. Enzim ADA amb solució PEG

Es basa en una solució que combina l'enzim adenosina-desaminasa amb un polièter anomenat polietilenglicol (PEG). Pot ser usat per permetre a les cèl·lules immunes recuperar-se, ja que conté l'enzim necessari que els hi falta a les cèl·lules per tenir un sistema immunitari sa. És un tractament crònic i extremadament car.

2.5.4. Teràpia Gènica

Un altre enfocament terapèutic i és el que veurem al llarg d'aquest treball és la teràpia gènica. És una tecnologia revolucionària que consisteix en la manipulació genètica de les cèl·lules del pacient prèviament extretes del seu organisme, i tornades a inserir després de tractar-les. Si aquestes cèl·lules arriben a la medul·la òssia i hi nien, podran començar a produir cèl·lules immunitàries sanes. La teràpia gènica s'ha utilitzat amb resultats satisfactoris als pacients amb ADA – SCID, tot i que en un altre tipus de SCID alguns pacients tractats amb teràpia gènica van desenvolupar certs tumors, i aquest ha estat un dels motius pels quals la teràpia gènica no s'ha convertit en un tractament habitual i s'estan realitzant molts assaigs amb ella.

Els primers experiments de teràpia gènica en humans es van iniciar el **1990**. Dues nenes amb SCID de deficiència d'ADA van ser tractades, en diverses ocasions, durant un període de 2 anys, amb les cèl·lules T que porten l'ADN corregit. Bàsicament, els investigadors van corregir l'ADN en una mostra de cèl·lules T de les noies i després van tornar a inserir a l'organisme les cèl·lules. L'èxit d'aquests primers assajos va ser centre d'un debat. Exàmens periòdics de les nenes van mostrar que les seves cèl·lules modificades sobreviuen i augmentava la producció de l'enzim ADA, però les nenes seguien rebent teràpia enzimàtica de substitució. Si bé aquest estudi no va produir una correcció d'èxit complet dels sistemes immunitaris de les nenes, demostrava que si posaves un gen correcte en suficients cèl·lules en un pacient malalt podies corregir la malaltia. Més endavant veurem altres exemples d'assaigs amb teràpia gènica que sí van tenir èxit.

3. TERÀPIA GÈNICA

La disponibilitat de tècniques que permeten introduir en un determinat organisme un gen estrany i fer que es desenvolupi, ha obert camí a la teràpia gènica, és a dir, la cura de pacients afectats per malalties hereditàries mitjançant la implantació d'un gen "correctiu" capaç de compensar el defecte genètic.

Quan es van anunciar els primers experiments de ADN recombinant amb bacteris, molts investigadors van reconèixer la possibilitat d'utilitzar aquesta nova tecnologia en el tractament de pacients amb malalties hereditàries. Aquest tipus de curació amb enginyeria genètica rep el nom de teràpia gènica. Aquesta es pot aconseguir a nivell individual, introduint en el pacient al·lels normals dels gens deficients que determinen la malaltia. Una alternativa més ambiciosa és aconseguir que el canvi perduri i es transmeti a les següents generacions.

Però abans que l'ADN recombinant es pogués utilitzar en éssers humans s'havien de superar certs obstacles. Era necessari localitzar i clonar els gens causants de les malalties genètiques en particular, i calia desenvolupar vectors especials que poguessin proveir de manera fiable i eficaç els gens a les cèl·lules humanes.

3.1. Rerefons històric

A la dècada dels vuitanta, els avanços en biologia molecular van permetre que els gens poguessin ser seqüenciats i clonats. Els científics, cercant un mètode de produir proteïnes fàcilment, van investigar la manera d'introduir els gens humans en l'ADN bacterià. D'aquesta manera, els bacteris modificats produïrien la proteïna corresponent, que podria ser purificada i injectada en les persones que no la sintetitzessin de forma natural.

Els científics però, volien estalviar-se la purificació contínua de la proteïna i la posterior injecció, i introduir els gens directament en cèl·lules humanes, centrant-se en un principi en les malalties causades per una sola mutació, com la fibrosi quística, l'hemofília o l'anèmia falciforme. Tanmateix, ha esdevingut molt més complicat que modificar un simple bacteri, principalment degut als problemes

que comporten traslladar grans quantitats d'ADN i que vagi a parar just en el lloc correcte del genoma.

El primer cas dut amb èxit de teràpia gènica es produí l'any **1990**, en què l'investigador Michael Blaese aconseguí guarir Ashanti da Silva, una nena de 4 anys que patia una rara immunodeficiència deguda a una mutació en un gen. Blaese va aplicar la teràpia gènica *ex vivo*: va extreure cèl·lules sanguínies de la nena, inserí en aquestes cèl·lules la còpia correcta del gen, i reintroduí les cèl·lules als vasos sanguinis de la nena. Com a resultat, da Silva va millorar notablement, i tot i que s'ha anat sotmetent a diferents controls, es pot considerar el primer cas d'un ésser humà guarit amb teràpia gènica.



Fig. 13. Cynthia i Ashanti (1992) amb el doctor Michael Blaese al centre.



Fig. 14. Michael Blaese amb Ashanti da Silva (esquerre) i Cindy Kisik (dreta) a la Conferència Nacional IDF de 2013.

Malgrat aquests principis encoratjadors, els avenços posteriors en teràpia gènica (que es comentarem més endavant) han estat més lents i han tingut menys èxit del que es pensava en un principi.

L'any **1990**, W. French Anderson, proposa l'ús de cèl·lules de la medul·la òssia tractades amb un vector retroviral que porta una còpia correcta del gen que codifica per l'enzim adenosina-desaminasa, el qual es troba mutat. Va realitzar la transformació *ex vivo* amb limfòcits T del pacient, que després es van tornar a introduir al cos. Cinc anys més tard, es van publicar els resultats de la teràpia que va contribuir a que la comunitat científica i la societat consideressin les possibilitats d'aquesta tècnica.

No obstant, el recolzament a la teràpia va estar qüestionat quan alguns nens tractats per al SCID van desenvolupar leucèmies. Les proves clíniques es van veure interrompudes en l'any **2002**, a causa del impacte que va suposar el

cas de Jesse Gelsinger, la primera persona reconeguda públicament que va morir a causa de la teràpia gènica. La seva mort va ser deguda al vector adenoviral per a la transducció del gen necessari per tractar la seva malaltia, el qual va causar una excessiva resposta immune, que va provocar una fallada multiorgànica i mort cerebral. L'any **2002**, quatre assaigs en funcionament de teràpia gènica es van veure paralitzats quan un nen tractat amb una malaltia similar va desenvolupar leucèmia. Posteriorment, després de revisar els procediments, es van reprendre els projectes en funcionament.

3.2. Tipus de teràpia gènica

En teoria és possible transformar tant les cèl·lules somàtiques (la majoria de cèl·lules del cos) com les germinals (com els espermatozoides, òvuls, i les cèl·lules mare precursors). Actualment, la totalitat de la teràpia gènica s'ha dirigit a les cèl·lules somàtiques, mentre que l'enginyeria de les cèl·lules germinals humanes roman només com a un projecte de futur altament controvertit.

- **Teràpia gènica germinal:** És aquella que està dirigida a modificar la dotació genètica de les cèl·lules implicades en la formació d'espermatozoides i òvuls, i per tant pot ser transmesa a la descendència. Aquest tipus de teràpia gènica seria la indicada per corregir de forma definitiva malalties congènites, una vegada que la tècnica sigui eficaç i segura. La teràpia gènica de línia germinal humana no ha estat practicada degut a les limitacions de la tecnologia de manipulació de cèl·lules germinals i a tot un seguit de limitacions ètiques.
- **Teràpia gènica somàtica:** És aquella dirigida a modificar la dotació genètica de cèl·lules no germinals, és a dir, de cèl·lules somàtiques o constituents de l'organisme. Per això, la modificació genètica no pot ser transmesa a la descendència. Per consens general entre tots els investigadors i amb la legislació actual, basada en motius ètics i de seguretat, solament es duen a terme protocols clínics en aquest tipus de teràpia gènica. En principi, la teràpia gènica somàtica no ha estat motiu de

tantes limitacions ètiques, excepte les relacionades amb l'objectiu de potenciar algun caràcter (per exemple l'altura).

3.3. Vectors

Els vectors són sistemes que ajuden en el procés de transferència d'un gen exogen a l'interior de la cèl·lula. Faciliten l'entrada i la biodisponibilitat intracel·lular del material genètic, de tal manera que aquest pugui funcionar correctament. Es poden definir les següent característiques per obtenir un "vector ideal" i adaptar-les a situacions concretes.

- Ha de ser capaç de reproduir-se i tenir una certa estabilitat.
- Ha de permetre la inserció de material genètic de qualsevol mida, i permetre la transducció tant en cèl·lules en divisió com en cèl·lules que no s'estan reproduint.
- El gen terapèutic s'ha de poder inserir en un lloc específic del genoma i només un cop per cèl·lula, per poder controlar-ne la dosis.
- Ha de reconèixer i actuar sobre unes cèl·lules específiques.
- L'expressió del gen terapèutic ha de ser completa i s'ha de poder regular.
- Ha de ser innocu o que els seus efectes secundaris siguin mínims i que li manquin elements que indueixin a una resposta immune.
- Ha de ser fàcil de produir i emmagatzemar i tot el procés ha de tenir un cost raonable.

Els vectors utilitzats no només contindran els gens funcionals que volem introduir en el pacient, sinó que també contindran altres elements necessaris per a l'expressió i la regulació del material genètic, ja siguin promotors, potenciadors o seqüències específiques que permetin regular l'expressió sota certes condicions.

Al llarg del temps s'han utilitzat diferents tipus de vectors, que es classifiquen en tres grups: virals, no virals i híbrids. Els vectors virals ofereixen com a avantatges la capacitat dels virus per infectar cèl·lules i facilitar l'expressió dels gens exògens però presenten com a desavantatges la resposta antiviral del sistema immunitari, sent un risc per al pacient i una limitació per al tractament amb dosis múltiples. Els vectors no virals són menys efectius, com sistemes de transferència gènica, però ofereixen com principal avantatge la seguretat. A més,

permeten que els gens puguin ser formulats com medicaments, ser estudiats farmacològicament i administrats al pacient d'una forma dosis-dependent.

La major part dels assaigs clínics en teràpia gènica, dirigits principalment a corregir problemes hereditaris o al tractament del càncer, han utilitzat com a vectors virals els retrovirus o adenovirus i com vectors no virals els complexos ADN-liposoma (lipoplexos).

3.3.1. Vector viral

Tots els virus ataquen els seus hostes i introdueixen el seu material genètic en la cèl·lula hoste com a part del seu cicle de replicació. Aquest material genètic conté instruccions de com produir més còpies d'aquests virus, segrestant la maquinària de producció cel·lular per servir les necessitats del virus. Les cèl·lules infectades es veuran forçades a produir més i més còpies del virus, amb el que cada cop es veuran infectades més cèl·lules. Certs tipus de gens normalment insereixen físicament els seus gens en el genoma de l'hoste. D'aquesta manera s'incorporarien els gens d'aquest virus en els de la cèl·lula durant el que li quedi de vida. No ho fan per regla general tots els virus però sí que n'hi ha alguns capaços de fer-ho.

Tot això és clarament una sobre simplificació, i existeixen nombrosos problemes que prevenen contra l'ús de vectors virals per a la teràpia gènica, tals com: problemes en la prevenció d'efectes no desitjats, assegurar-se de que el virus infectarà la cèl·lula correcta en el cos, i assegurar-se de que el gen inserit no interromprà cap gen vital ja existent en el genoma.

- **Retrovirus:** Són virus que tenen la informació genètica en forma d'ARN. Un cop infectada la cèl·lula, l'ARN es converteix en ADN. L'ADN viral s'insereix a l'atzar en el genoma de la cèl·lula, replicant-se cada cop que la cèl·lula infectada es replica i expressant els gens virals a la resposta de diferents senyals de les cèl·lules. Després de ser integrat, el gen terapèutic s'expressa utilitzant enzims de la cèl·lula en la qual s'allotgen. Una de les preocupacions en el desenvolupament inicial dels retrovirus va ser la

possibilitat de que s'insertessin a prop d'**oncògens** i poguessin transformar la cèl·lula en cancerígena.

- Adenovirus:** Els adenovirus són virus d'ADN de doble cadena. Per construir els vectors adenovirus s'han d'eliminar els gens que codifiquen les proteïnes essencials per la replicació viral. Aquestes modificacions fan l'adenovirus deficient i generen espai per inserir el gen terapèutic. Els adenovirus poden transportar gens d'una longitud més gran. Aquests tipus de vectors tenen una gran eficiència de traducció, són utilitzats per el desenvolupament de la teràpia gènica per les dues malalties pulmonars més freqüents, com la fibrosis quística i la deficiència d'antitripsina. Una característica dels adenovirus és que el material genètic viral no s'integra al genoma de la cèl·lula. Això fa que el risc de produir gens mutants sigui pràcticament nul, tot i així, l'expressió del gen terapèutic en les cèl·lules que s'estan replicant es perd quan es divideix a la cèl·lula.
- Virus adenoassociats:** Són virus que pertanyen al grup de parvovirus humans, i són naturalment deficients a la replicació, ja que necessiten un adenovirus o un virus herpesvirus (HSV) per iniciar el cicle de la replicació viral.
- Herpesvirus:** Els herpesvirus (HSV) són virus de ADN de doble cadena, amb un tropisme per les cèl·lules del sistema nerviós. Aquests virus estableixen una infecció en les neurones, generalment benigna.

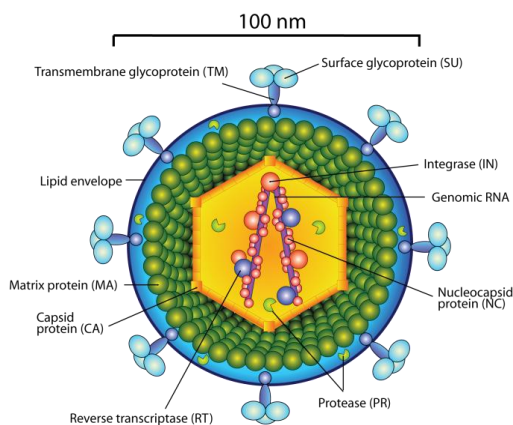


Fig. 15. Estructura d'un retrovirus

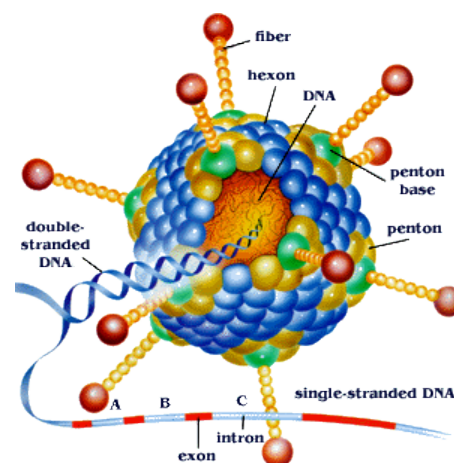


Fig. 16. Estructura d'un adenovirus

3.3.2 Vectors no virals

Els vectors no virals representen un intent d'imitar les funcions dels virus com a vehicles de transferència gènica mitjançant sistemes sintètics, de manera que en principi són vectors molt més segurs des del punt de vista de la perillositat biològica i la patogenicitat que representen els virus. En aquests sentit, els vectors no es diferencien conceptualment de fàrmacs als que estem acostumats. La principal limitació d'aquest tipus de vectors és que a l'actualitat la seva eficàcia *in vivo* és molt menor que la dels vector virals.

- **ADN nu:** Aquest és el mètode més simple de transfecció no viral. S'han dut a terme assaigs clínics consistents en injectar plasmidis d'ADN nu intramuscular amb certs resultats limitats i una expressió molt més baixa comparada amb altres mètodes de transfecció. A més dels assaigs amb plasmidis s'han dut a terme alguns amb ADN nu provinent de la PCR (tècnica utilitzada en biologia molecular, amb l'objectiu d'obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN específic a partir d'una quantitat mínima) amb un èxit semblant al primer, però que tanmateix no es pot comparar amb altres mètodes no virals molt més eficients com l'electroporació o l'ús de la biobalística, que consisteix en disparar partícules d'or cobertes d'ADN cap a les cèl·lules a altes pressions de gas.
- **Oligonucleòtids:** L'ús d'oligonucleòtids sintètics en la teràpia gènica s'usa per inactivar els gens implicats en la malaltia. Hi ha diversos mètodes pels quals es pot aconseguir això. Una estratègia és la teràpia "antisentit" que utilitza els oligonucleòtids amb la seqüència complementària de l'ARNm del gen diana per interrompre la seva transcripció. Un altra possibilitat consisteix en utilitzar oligodesoxinucleòtids com a esquers pels factors que es necessiten en l'activació de transcripció del gen diana. Els factors de transcripció s'uneixen als esquers en comptes de als promotors del gen defectuós, per tant es redueix l'expressió del gen defectuós.

Igual que la tècnica del ADN nu, es necessiten mètodes de transformació per introduir aquestes tècniques dins la cèl·lula.

- Liposomes i poliplexes:** Milloren el transport del ADN cap a les cèl·lules, ja que el protegeixen de l'entorn que el pugi malmetre i en faciliten l'entrada a la cèl·lula. El plasmidi de ADN pot estar recobert amb lípids en una estructura organitzada com una micel·la o un liposoma. L'ús més comú de lipoplexos s'ha donat en la transferència genètica a cèl·lules canceroses, on els gens substituïts han activat els gens supressors de tumors de la cèl·lula i disminuït l'activitat dels oncògens. La majoria de poliplexes consisteixen en polímers catiónics i la seva producció es troba regulada per interaccions iòniques. Una gran diferència entre el mètode d'acció de poliplexes i el de lipoplexos és que els poliplexes no poden alliberar l'ADN que transporten, en el citoplasma.

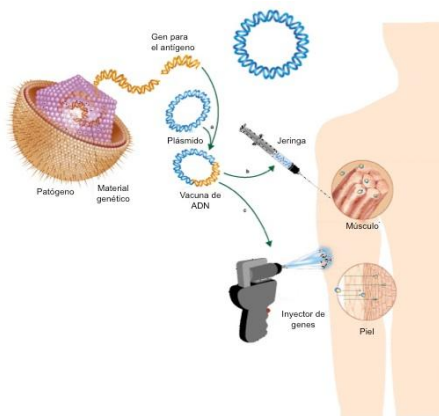


Fig. 17. Tècnica d'injecció de DNA nu

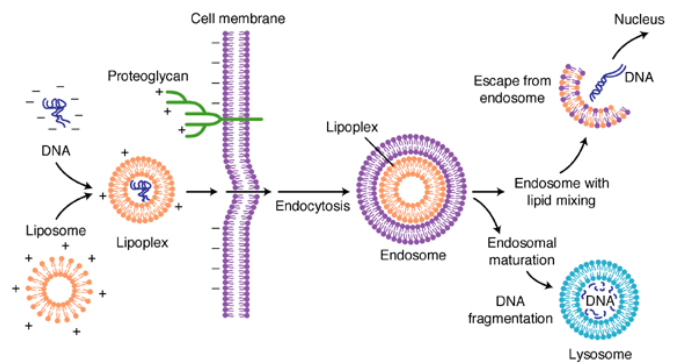


Fig. 18. Mètode d'inserció del DNA dins la cèl·lula amb lipoplexos

3.3.3. Vectors híbrids

Com que tots els mètodes de transferència de gens tenen defectes, s'han desenvolupat alguns mètodes híbrids que combinen dues o més tècniques. Els virosomes en són un exemple, que combinen liposomes amb el virus inactiu VIH o el virus de la grip.

A continuació podem observar una taula resum amb els vectors mencionats anteriorment i altres que no s'utilitzen tan freqüentment:

VECTOR	AVANTATGES	DESAVANTATGES
Retrovirus	Transferència eficient	Transfereix el ADN només a cèl·lules en divisió, insereix a l'atzar: pot activar oncògens
Adenovirus	Transferència a cèl·lules que no estan en divisió	Produeix reacció immunitària
Virus adenoassociats	No produeixen reacció immunitària	Conté una quantitat petita de ADN, difícil de produir
Herpesvirus	Es poden inserir en cèl·lules del sistema nerviós central, no provoquen reacció immunitària	Difícil de produir en grans quantitats
Lentivirus	Poden transportar gens de mida gran	Preocupacions sobre la seguretat
Liposomes i poliplexos	No hi ha replicació, no estimula reacció immunitària	Baixa eficàcia
Injecció directa	No hi ha replicació, dirigida a teixits específics	Baixa eficàcia, no actua bé dins alguns teixits
Tractament amb pressió	És segur, ja que és un procediment <i>ex vivo</i>	Més eficàcia amb molècules petites de ADN
Pistola gènica	No hi ha vectors	Baixa eficàcia

Fig. 19. Taula on es mostren els vectors més comuns utilitzats en teràpia gènica

3.4. Procediment

Depenent del lloc on es manipulin les cèl·lules parlarem de teràpia gènica *ex vivo* o *in vivo*.

- **In vivo:** La teràpia gènica *in vivo* és la modificació genètica de la cèl·lula a l'interior de l'organisme. Per la teràpia *in vivo* s'utilitzen vectors de ADN recombinant per introduir-se dins les cèl·lules somàtiques transportant el gen terapèutic. Aquests virus s'injecten directament al pacient quan les cèl·lules no poden ser cultivades o reemplaçades en l'individu afectat. La cèl·lula a la que se l'hi ha introduït un gen de forma artificial s'anomena cèl·lula transgènica, i el gen involucrat s'anomena **transgen**. Aquesta teràpia s'usa per exemple en malalties pulmonars, ja que no és recomanable extreure cèl·lules pulmonars i després tornar-les a introduir.
- **Ex vivo:** En el cas de la teràpia gènica *ex vivo*, la manipulació genètica es porta a terme fora de l'organisme. En aquests cas, s'extreuen les cèl·lules del pacient, es cultiven en el laboratori, se'ls hi introdueix el gen terapèutic i es tornen a introduir al pacient. Aquests procés és més fàcil amb cèl·lules mare, com el cas de l'ADA-SCID, amb l'obtenció de medul·la òssia, la modificació genètica de les cèl·lules mare en el laboratori i la seva posterior introducció a l'organisme amb la versió funcional del gen retornat al pacient. La introducció del gen ADA funcional en les cèl·lules progenitores del sistema immunològic ha curat ja a nens amb aquesta malaltia, en alguns assajos clínics. Lògicament, el mètode d'introducció d'un gen terapèutic dependrà del teixit diana de la teràpia i l'objectiu de la teràpia.

A la majoria d'estudis de teràpia gènica, una còpia del gen funcional s'insereix en el genoma per compensar el defectuós. Si aquesta còpia simplement s'introdueix en el genoma i no es treu el gen defectuós, es tracta de teràpia gènica d'adició. En canvi quan tractem per mitjà de la recombinació homòloga, vol dir que el gen que inserim es canvia pel gen defectuós i aquest s'elimina, és a dir, que el gen correcte substitueix l'altre.

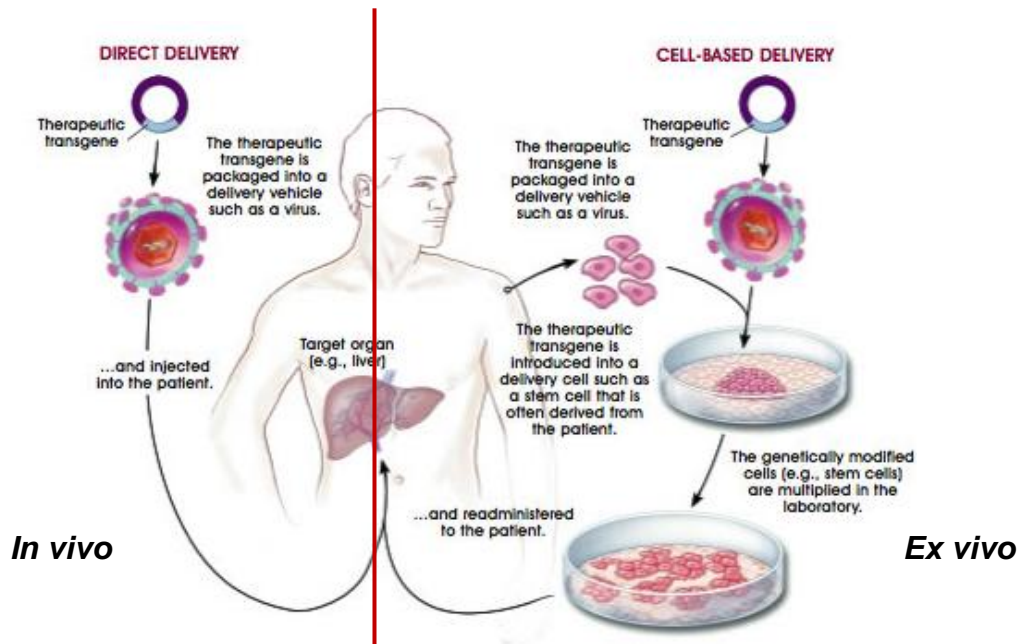


Fig. 20. Procediment in vivo (esquerre) i procediment ex vivo (dreta)

3.5. Cèl·lules diana

Les cèl·lules diana es seleccionen en funció del tipus de teixit en el qual s'ha d'expressar el gen introduït, i han de ser a més cèl·lules amb una vida mitjana llarga, ja que no té sentit transformar cèl·lules que en poc temps moriran. També s'ha de tenir en compte si la cèl·lula diana és una cèl·lula en divisió o quiescent, perquè determinats vectors virals, com els retrovirus, només infecten cèl·lules en divisió.

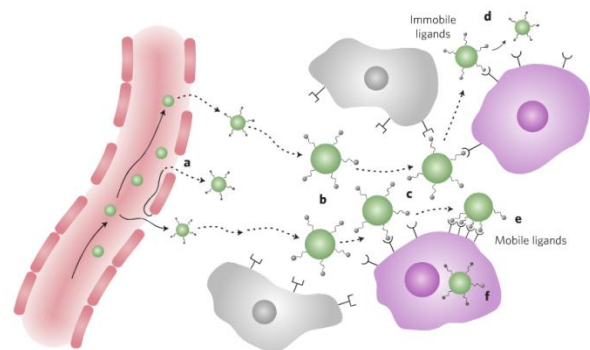


Fig. 21. Els virus reconeixen a les cèl·lules diana gràcies a uns factors característics

En funció d'aquestes consideracions, les cèl·lules diana ideals serien les cèl·lules mare, ja que la inserció d'un gen en elles produiria un efecte a llarg termini. A causa de l'experiència en trasplantaments de medul·la òssia, les cèl·lules diana més treballades són les cèl·lules mare hematopoètiques (les cèl·lules mare de la sang). La teràpia gènica en aquestes cèl·lules és tècnicament possible i és un teixit molt adequat per a la transferència ex vivo.

3.6. Aplicacions

- **Marcatge gènic:** El marcatge gènic té com a objectiu, no la curació del pacient, sinó fer un seguiment de les cèl·lules, és a dir, comprovar si en un determinat lloc del cos són presents les cèl·lules específiques que s'han marcat. Per exemple, en un pacient de càncer (leucèmia) al qual se li ha realitzat un trasplantament, és necessari saber d'on procedeixen les cèl·lules, si són de cèl·lules trasplantades o si són cèl·lules que han sobreviscut al tractament.
- **Teràpia de malalties monogèniques hereditàries:** S'usa en aquelles malalties en les quals no es pot fer, o no és eficient, l'administració de la proteïna dèficit. Es proporciona el gen defectuós o absent.
- **Teràpia de malalties adquirides:** Entre aquest tipus de malalties la més destacada és el càncer. S'usen diferents estratègies, com la inserció de determinats gens suïcides en les cèl·lules tumorals o la inserció d'antígens tumorals per potenciar la resposta immune.

3.6.1. Càncer

El tractament del càncer fins al moment ha implicat una destrucció de les cèl·lules cancerígenes amb agents quimioterapèutics, radiació o cirurgia. Tot i així, la teràpia gènica és una altra estratègia que en alguns casos ha aconseguit que la mida dels tumors sòlids disminueixi en un percentatge molt significatiu.

L'estratègia més utilitzada, és l'ús dels **gens suïcides**. Es tracta de transferir a les cèl·lules tumorals un gen que codifiqui una proteïna capaç de provocar la mort cel·lular. És molt popular l'ús del gen de la timidín-kinasa del virus del Herpes Simplex (HSV-tk), que codifica una altra proteïna (ganciclovir trifosfat) que pot provocar la mort de les cèl·lules que es divideixen activament, i així eliminar les cèl·lules tumorals selectivament.

Aquesta estratègia s'ha utilitzat en tumors cerebrals, fent servir vectors retrovirals per eliminar només cèl·lules tumorals (en divisió) però no neurones. També s'ha utilitzat amb èxit en tumors hepàtics, utilitzant en aquest cas vectors adenovirals.

Una altre estratègia utilitzada en la teràpia gènica del càncer, es basa en la substitució de les cèl·lules malignes amb **gens supressors tumorals**. Per últim, una de les estratègies que ha tingut més èxit i que ofereix millors perspectives de futur és la **immunopotenciació**, és a dir, afavorir la resposta immune davant de les cèl·lules tumorals.

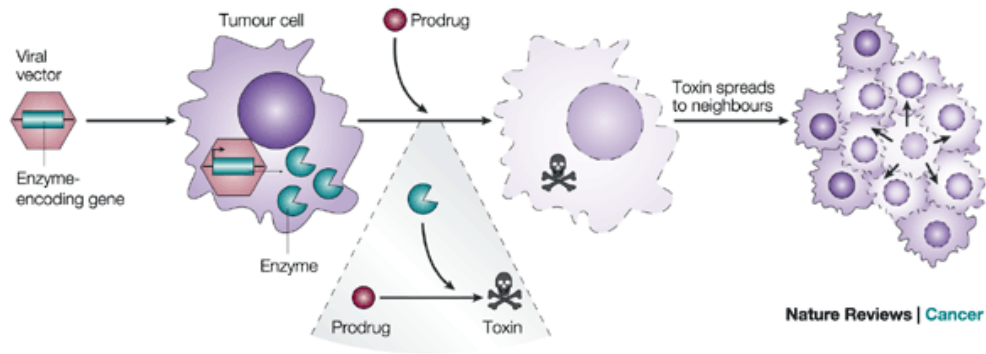


Fig. 22. Abordatge genètic en el càncer, acció dels gens suïcides.

3.6.2. Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)

Aquest síndrome és una malaltia recessiva lligada al cromosoma X caracteritzada per ser una immunodeficiència lligada als limfomes i a les malalties autoimmunitàries. També hi ha una versió més lleu d'aquesta malaltia coneguda com trombocitopènia lligada al cromosoma X que és caracteritzada per ser una malaltia congènita amb plaquetes petites. Ambdues malalties estan produïdes per mutacions en el gen WAS que codifica per una proteïna multidomini que només s'expressa en cèl·lules WASP.

Per tant la majoria dels que tenen aquesta malaltia pateixen una mort prematura degut a infeccions, hemorràgies, càncer o anèmia. Actualment, s'han realitzat tractaments eficaços en pacients amb aquest síndrome a través de transplantaments de medul·la òssia o sang del cordó umbilical d'un donant HLA idèntic o compatible. Després de la teràpia gènica, van detectar nivells significatius de la proteïna WASAP en les diferents cèl·lules del sistema immune dels pacients. El resultat va ser que els pacients van tenir varies millores, i un d'ells es va recuperar per complet de l'anèmia autoimmune.

PART EXPERIMENTAL

4. PRÀCTICA: Modificació genètica de cèl·lules de llevat

Per poder realitzar la següent pràctica vam necessitar la col·laboració del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB), que ens va proporcionar la idea i l'ajuda necessària per dur-la a terme.

El fet que la teràpia gènica sigui un tractament mèdic destinat als humans, se'ns feia impossible poder dur a terme una pràctica del tema en concret. Però al PRBB ens van oferir la possibilitat de realitzar un procés semblant a escala més petita, és a dir, manipular genèticament unes cèl·lules de llevat. La pràctica consisteix en la modificació d'un dels gens del llevat i en marcar-ne un altre amb proteïnes fluorescents.

La teràpia gènica comporta moltes més complicacions, ja que les cèl·lules humanes són molt més complexes que les cèl·lules de llevat, el procediment és més difícil i extens. Tot i així, la pràctica ens ha servit per veure la veritable complexitat del procés, ja que encara que s'utilitzin cèl·lules de llevat no sempre s'obtenen els resultats esperats.

4.1. Objectiu i hipòtesi

Portar a terme la suplantació del gen *HOG1* amb el casset *kanMX6*, i el marcatge del gen *HHF2* amb els cassets *yeGFP-KITRP1* i *ECFP-KITRP1*.

L'eliminació del gen *HOG1* es durà a terme a partir de la recombinació homòloga del gen pel casset escollit. Es comprovarà la correcta eliminació per mitjà d'una PCR amb els primers específics del casset seleccionat i es podrà verificar per *Western Blot* (Transferència Western), amb anticossos dirigits contra la proteïna que sintetitza el gen *HOG1*. Si el gen ha estat suplantat correctament els anticossos anti-HOG1 no haurien d'afectar les cèl·lules i la PCR hauria de donar-nos algun resultat.

El marcatge correcte de *HHF2* amb les proteïnes fluorescents es comprovarà també per PCR i, en aquest cas, es podrà verificar observant les cèl·lules en un microscopi de fluorescència. Els nuclis dels llevats que hagin incorporat els cassets de marcatge del gen *HHF2* haurien d'aparèixer fluorescents.

4.2. Material

-Pipetes

-Vas de precipitats

-Matràs aforat

-Tubs d'assaig

-Gradeta

-Plaques de petri

-Gel

-Fogonet

-Centrifugadora

-Vòrtex

-PCR

-Electroforesi

-Porta objectes

-Cobra objectes

-Microscopi de fluorescència

- Productes

-Aigua esterilitzada

-Llevats (soques estables amb varies mutacions dels laboratoris)

-Agar YPD

-Solució AcLi

-Solució PEG (polietilenglicol)

-Solució TE

-ssDNA (ADN de l'esperma de salmó)

-Dissolvent orgànic DMSO

-Solució per a la PCR:

-Buffer

-MgCl₂

-dNTPs

-oligonucleòtids

-Taq polimerasa

-Agarosa

-Bromur d'etidi

4.3. Metodologia

Dia 1

El primer dia s'han de preparar les mostres de les cèl·lules que utilitzarem, i deixar-les a una temperatura favorable.

- Cal preparar un cultiu de les cèl·lules de llevat silvestre que volem transformar: 3ml de YPD (extracte de llevat peptona dextrosa, és un mitjà complet per al creixement del llevat).

La versió d'agar YPD consisteix en 0,3% d'extracte de llevat, 1% de peptona, 1% de glucosa/dextrosa, 2% agar, i la resta aigua destil·lada.

Deixarem el cultiu en un matràs aforat perquè les cèl·lules de llevat proliferin.

Dia 2

El segon dia s'han de preparar les diferents solucions que contindran les cèl·lules que volem modificar i els diferents marcadors.

- Diluïm el cultiu del dia anterior en 50ml YPD fins a $OD_{600}^* = 0,2$. Deixem créixer la mostra unes 3h i 30min fins a $OD_{600} = 0,8-1$.

* OD_{600} : És una abreviatura que indica la densitat òptica d'una mostra a una longitud d'ona de 600nm, mesurada per un aparell anomenat espectrofotòmetre. És un mètode comú per l'estimació de la concentració de cèl·lules. Pot indicar en quina fase de població es troben les cèl·lules. En aquest cas es necessita que estiguin en la fase exponencial de creixement.

- Un cop deixem preparades les cèl·lules de llevat cal transformar els llevats amb els cassets per a l'eliminació de *HOG1* i els marcatges de *HHF2*, sense oblidar el control negatiu sense ADN. Finalment haurem de plaquejar en plaques les mostres de llevat.

1. Durant el temps que deixem créixer fins a la fase exponencial la nostra població de llevat preparem les tres solucions de transformació. Aquestes solucions prepararan les cèl·lules perquè siguin capaces d'acceptar l'ADN. Com que treballem amb substàncies que es poden contaminar, cal treballar en una àrea esterilitzada, com per exemple al costat d'una flama.

A cada tub d'assaig col·loquem les següents solucions:

Solució de AcLi	Solució PEG	Solució TE
1ml TE 10x	1ml TE 10x	1ml TE 10x
1ml AcLi 10x (1M)	1ml AcLi 10x (1M)	9ml H ₂ O
8ml H ₂ O	8ml PEG 50%	

Fig. 23. Les tres solucions preparades amb el contingut corresponent de cada una



Fig. 24. Autores del treball preparant les diferents dissolucions.

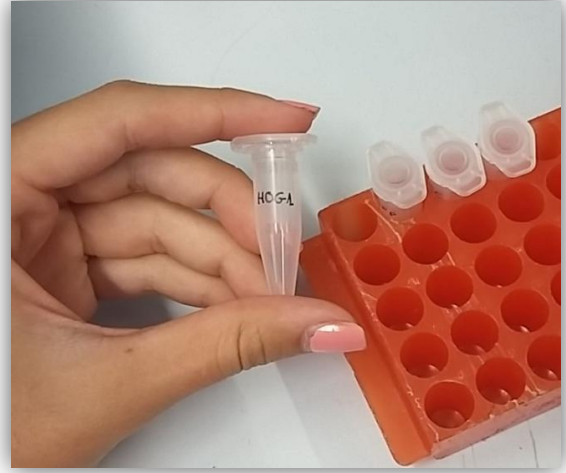


Fig. 25. Tubs d'assaig utilitzats en l'experiment

2. Mentre realitzem les diferents solucions, també s'ha de preparar una solució amb ssDNA (ADN de l'esperma de salmó), que cal escalfar-lo a 100°C durant 10 minuts, i després refredar-lo de seguida amb gel a uns 4°C.

Cal afegir l'ADN de salmó (ssDNA) a les solucions amb l'ADN recombinant que ens interessa a nosaltres per introduir-los junts dins les cèl·lules de llevat. Les nucleases s'encarreguen de degradar l'ADN de salmó, mentre que el nostre ADN queda intacte sense veure's afectat per l'acció d'aquests enzims.

El ssDNA és una substància molt densa, per tant a l'hora d'extreure el contingut dels tubs d'assaig per a les mostres s'ha de fer amb molta cura amb les pipetes.

3. Un cop hem fet les tres solucions i hem preparat el ssDNA, col·loquem en una gradeta quatre tubs d'assaig i els etiquetem amb el nom del contingut que hi posarem: *HOG1* que serà la solució en la que recombinarem un gen per un casset, *HHF2-GFP* i *HHF2-ECFP* que seran les solucions a les quals hi afegirem els gens de les proteïnes fluorescents, i finalment el control negatiu.

Preparem uns altres tubs d'assaig estèrils on posarem mostres de cèl·lules de llevat per a cada solució.

4. Traiem el matràs on han estat creixen els llevats de la càmera de fred per escalfar a temperatura ambient, i preparem banys a 30°C i 42°C on més endavant haurem d'escalfar les mostres.
5. Repartim les cèl·lules en quatre tubs d'assaig i les centrifuguem 5 minuts a 3000 r.p.m. Amb aquest procediment ens queden les cèl·lules al fons del tub, mentre que el que sobra del medi de cultiu ho eliminem per decantació. Afegim 500µL d'aigua esterilitzada per netejar les cèl·lules i ho tornem a centrifugar durant 1 minut més a 3000 r.p.m.
6. Tornem a extreure la substància sobrant del tub d'assaig amb la pipeta per obtenir només les cèl·lules i hi afegim 500µL de la solució d'AcLi que hem preparat anteriorment, per tal de fer les cèl·lules competents per acceptar l'ADN. En aquest punt del protocol podem parar, sempre que es conservin les cèl·lules a 4°C.
7. Preparem el mix per a cada transformació
 - a) 10µL de ssDNA bullit durant 10 min (és molt important obrir el tub en un espai esterilitzat, a prop d'una flama).
 - b) ADN per transformar: 1µL maxi/ 2µL *warryprep*/ 12µL de deleció o integració.
 - c) 100µL de cèl·lules competents.
 - d) 600µL de solució PEG
8. Arribats a aquest punt hem de tenir quatre tubs d'assaig amb les solucions corresponents, un amb el control negatiu, dos amb les proteïnes fluorescents del gen *HHF2* i un altre solució amb el casset del gen *HOG1*. Passem els quatre tubs pel vòrtex per tal que les solucions quedin ben homogènies.
9. Col·loquem les solucions a un bany de 30°C durant 45 minuts.

10. Afegim 70µL de DMSO, que és un dissolvent inorgànic que s'utilitza per debilitar la membrana cel·lular. Cal anar amb compte ja que és un producte inflamable.
11. Tornem a afegir les solucions a un bany, aquest cop a 42°C durant 15 minuts. És molt important que el temps sigui exacte.
12. Centrifuguem les mostres durant 1 min a 3000 r.p.m. Amb una pipeta en traiem el medi sobrant, i suspenem les cèl·lules amb 100 µL de la solució TE. Aquesta solució ens servirà per poder controlar en tot moment el pH de les cèl·lules.
13. Un cop hem afegit la solució TE plaquegem cada transformació en una placa de petri diferent amb el medi adequat, i etiquetem cada placa per saber quina transformació ha patit aquell conjunt de cèl·lules.



Fig. 26. Plaqueig de les cèl·lules

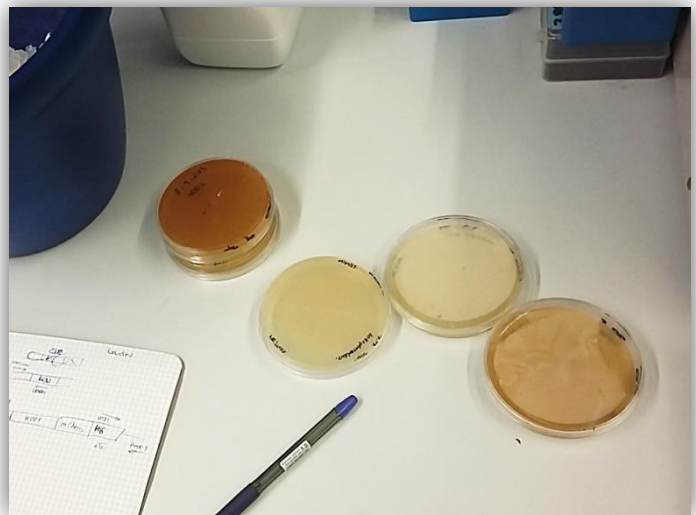


Fig. 27. Plaques de petri amb els diferents tipus de cèl·lules

Dia 4-5

El quart o cinquè dia tornem als laboratoris per veure les nostres colònies de cèl·lules. Cal venir uns dies després per tal que les cèl·lules tinguin temps de reproduir-se. Aquest cop haurem de preparar les mostres per fer-li a cada una una PCR i després visualitzar els fragments d'ADN per electroforesi en gel. Això ens servirà per veure si han incorporat el nou casset i han eliminat el gen *HOG1*. Per veure s'hi els altres llevats han incorporat les proteïnes fluorescents ho comprovarem amb un microscopi de fluorescència i PCR. La PCR s'encarregarà de fer còpies dels nostres fragments d'ADN. Els *primers* que col·locarem a la solució de la PCR només es complementen amb el casset que substitueix el gen *HOG1*, o bé en l'altre cas amb els que es complementen amb els cassets de les proteïnes fluorescents. Per tant, només ens hauria de donar resultat si el genoma de les cèl·lules ha estat modificat.

- Preparem una solució que afegim a les quatre mostres que havíem preparat els dies anteriors. Aquesta solució ens servirà per a la PCR.

COMPONENTS PER A LA SOLUCIÓ PCR
20,25µL x 4= 81µL d'aigua esterilitzada
6µL x 4= 24µL de Buffer (conté els tints per a la visualització)
1,8µL x 4= 7,2µL de MgCl ₂
0,6µL x 4= 2,4µL de dNTPs
0,6µL x 4= 2,4µL de cada primer, per tant 4,8µL
0,15µL x 4= 0,6 µL de la Taq polimerasa (enzim)

Fig. 28. Taula on es mostren els components de la solució necessària per fer una PCR

- Un cop hem preparat la dissolució per a la PCR l'afegim a les mostres. Abans però, haurem de preparar sis tubs d'assaig on col·locarem els diferents controls. En el primer hi posarem un control negatiu, mentre que en el segon i el tercer hi posarem unes petites mostres de cèl·lules que haurien d'haver substituït el gen *HOG1*. Per tant, només la segona i la tercera mostra s'haurien de visualitzar.

En un quart tub hi tornarem a posar un control negatiu, però en aquest cas del conjunt de cèl·lules que haurien hagut de marcar el gen *HHF2* amb les proteïnes fluorescents. En el cinquè i el sisè tubs hi col·locarem mostres d'aquest tipus de cèl·lules més la solució per a PCR.

- Configurem la PCR i hi afegim les mostres:

Etapes	Temperatura	Temps
Inicialització	Escalfem la reacció fins a 94°C. Això és necessari, ja que la Taq polimerasa s'activa amb calor.	Duració: 3:00 minuts
Cicles	1r cicle: s'escalfa la reacció a 94°C.	Duració: 0:30 minuts
	2n cicle: es baixa la temperatura fins a 55°C.	Duració: 0:30 minuts
	3r cicle: es torna a escalfar la reacció, aquest cop a 72°C.	Duració: 1:00 minut
Elongació final	S'escalfa la reacció a 72°C i s'assegura que qualsevol ADN de cadena simple sigui ampliat.	Duració: 10:00 minuts
Conservació	Aquest pas es duu a terme a 4°C per conservar la reacció a curt termini.	Temps indefinit

Fig. 29. Taula on es mostra la configuració de la PCR

- Després de la PCR cal visualitzar les dissolucions per electroforesi. Preparem el gel que utilitzarem per veure els fragments d'ADN. El nostre gel tindrà una concentració de 1,5%, per tant contindrà 1,5g d'agarosa i 150ml d'aigua. Hi afegim una petita quantitat de bromur d'etidi, que és un colorant que ens permetrà veure els fragments. La mescla es diposita en un motlle on es solidificarà, és important col·locar-hi a la part superior del motlle una plantilla dels *pouets*. Els *pouets* són uns petits forats en el gel on

hi dipositarem les mostres, per tant cal col·locar la plantilla abans de que s'assequi el gel.

- Dipositem les sis mostres en sis *pouets* diferents i connectem el gel al corrent elèctric. Els grups fosfats de l'ADN tenen càrrega negativa, per tant amb el corrent elèctric es dirigiran cap al pol positiu. La velocitat dependrà de la mida dels fragments de l'ADN. Deixem l'electroforesi en procés durant mitja hora o una hora. Un cop hagi passat aquest temps agafem les mostres i els hi apliquem llum ultraviolada. D'aquesta manera podrem observar els diferents fragments com franges a diferents nivells.
- Agafem una altra petita quantitat de cèl·lules que contenen les proteïnes fluorescents i les col·loquem en un portaobjectes. Aquestes mostres les observarem en un microscopi de fluorescència a uns 100 augments.



Fig. 30. PCR utilitzada



Fig. 31. Electroforesi en gel de les mostres

4.4. Resultats

En primer lloc, podem observar les cèl·lules de llevat que vam veure pel microscopi de fluorescència. Si apliquem la longitud d'ona corresponent a l'activació de cada proteïna, veurem els nuclis cel·lulars d'un color o un altre

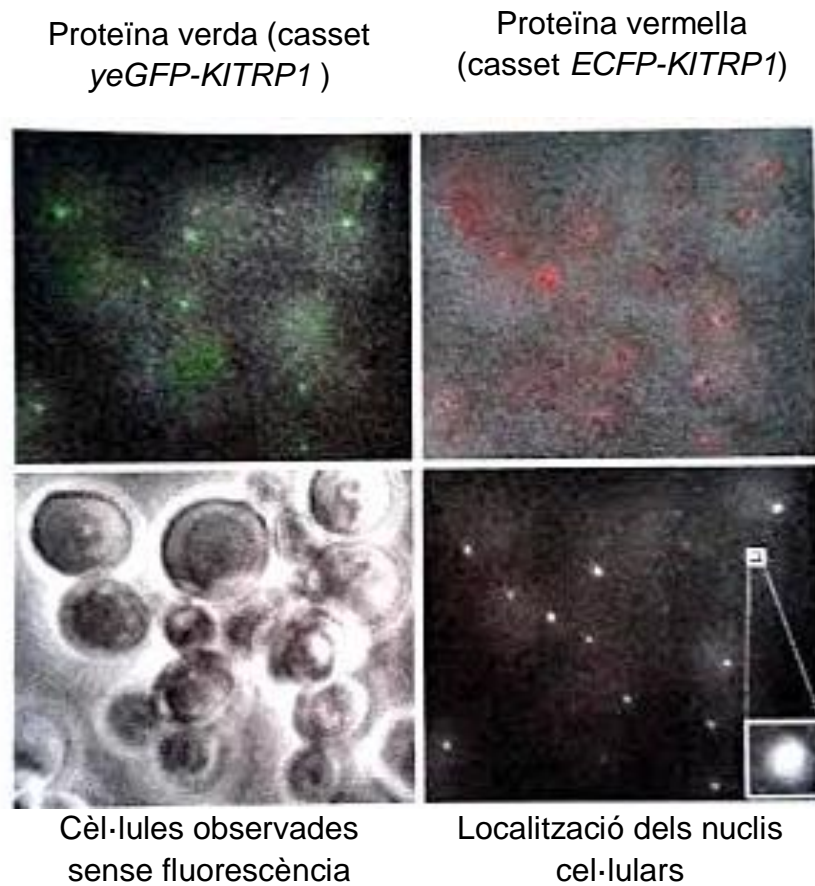


Fig. 32. Imatges obtingudes a partir del microscopi de fluorescència

La següent imatge representa els resultats donats per la PCR, que comentarem a les conclusions.

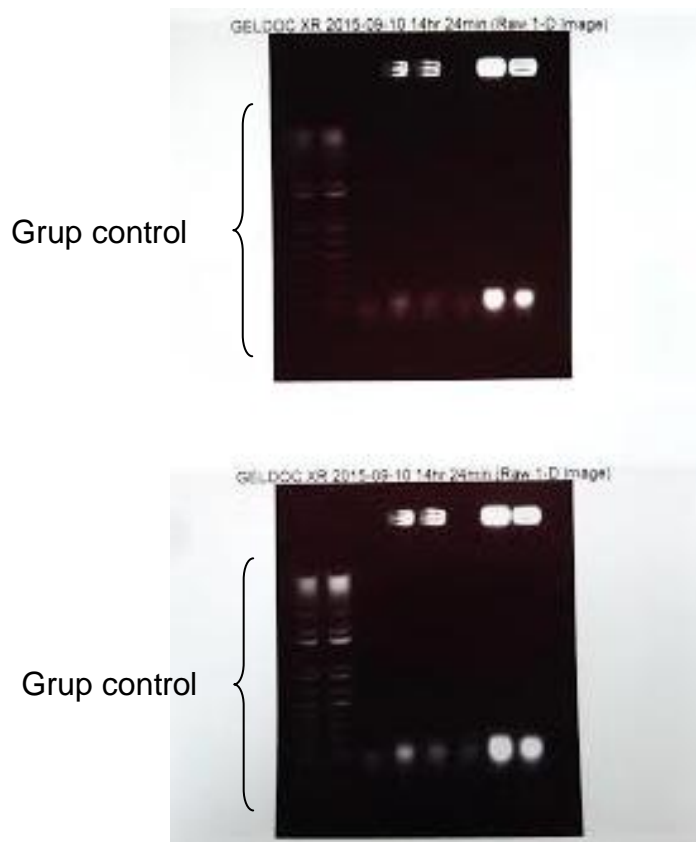


Fig. 33. Resultats de la PCR sobre la recombinació homòloga del gen HOG1 i el marcatge del gen HHf2

4.5. Conclusions

Després de realitzar la pràctica hem arribat a dues conclusions.

- El marcatge del gen HHF2 amb les proteïnes fluorescents ha estat un èxit. Tal i com es pot veure en els resultats, amb el microscopi de fluorescència hem pogut observar els nuclis de les cèl·lules il·luminats, ja que el gen HHF2 codifica per les histones, que són unes proteïnes que es troben al nucli cel·lular. Si traiem la llum fluorescent, podem observar les cèl·lules, i si superposem les imatges de fluorescència i sense fluorescència veurem a quin espai de la cèl·lula es troba el nucli.
- En el cas de la PCR hem tingut més problemes, ja que no ens ha donat cap resultat. Tot i així, creiem que el problema es troba en la PCR o la seqüenciació de l'ADN, per diversos motius. Per començar, les cèl·lules a les quals havíem recombinat el gen HOG1, les havíem posat a créixer en un medi especial perquè només proliferessin aquelles cèl·lules que haguessin incorporat el casset de recombinació. El fet de trobar colònies cel·lulars dies després ens fa pensar que el procediment seguit abans de la PCR havia estat correcte. A més, el conjunt de cèl·lules que hem observat pel microscopi de fluorescència són les mateixes a les quals hem aplicat la PCR. Per tant, aquestes cèl·lules si que havien incorporat els cassets de fluorescència tot i que la PCR i la seqüenciació no donessin resultats.

Finalment, aquesta pràctica ens ha estat útil per veure la complexitat del procés, observar de primera mà els estris utilitzats en la modificació genètica i entendre la importància de tenir a les mans un poder tan revolucionari i important com aquest, el poder de crear i modificar noves espècies amb poques limitacions.

5. ENTREVISTES A ESPECIALISTES

A continuació us presentem les entrevistes que hem realitzat al llarg d'aquest treball, per resoldre dubtes i per tal que aquests especialistes ens ajudin a arribar a unes conclusions finals més completes i puguem aconseguir el nostre objectiu.

5.1. Cristina Fillat

La Dra. Fillat lidera el Grup de Teràpia Gènica i Càncer (*Gene Therapy and Cancer Group*) com a part de l'Oncologia Gastrointestinal i Pancreàtica de l'equip del IDIBAPS. És la investigadora principal del Grup U716 en el Centre d'Investigació Biomèdica en la Xarxa de Malalties Estranyes (CIBERER), Barcelona, Espanya.



Va obtenir un doctorat en Bioquímica l'any 1990 i es va iniciar en el camp de la teràpia gènica durant la seva etapa post doctoral al *Mount Sinai School of Medicine* a Nova York.

L'any 1995 es va iniciar en el camp del càncer de pàncrees, i va mostrar interès tant en el coneixement de la fisiopatologia i complexitat molecular del càncer de pàncrees, com en l'exploració de les teràpies contra el càncer, amb especial èmfasis en les teràpies basades en gens virals. La seva feina actual es centra en dues grans vies d'investigació:

- La identificació de vies cel·lulars específiques i determinants moleculars que actuen com a mediadors entre les cèl·lules neoplàsiques i el microambient.
- En l'avaluació preclínica de estratègies terapèutiques basades en adenovirus oncolítics dirigides a tumors pancreàtics.

-La Teràpia Gènica a la dècada dels 90 era la gran promesa del futur. Per què en més de 25 anys no hi ha hagut un gran avanç? Per exemple en el cas de les cèl·lules mare, sí que hem sentit més a parlar-ne.

Bé, jo estaria bastant en desacord. Totes aquestes investigacions han tingut

booms. La ciència avança i d'alguna manera apareix una nova tecnologia, sembla que hi ha moltes expectatives posades en el fet i se'n fa un gran desenvolupament. Després a vegades les expectatives han sigut més grans que els resultats, i això entra en una fase estacionària i després va seguint la seva evolució. En el cas de les cèl·lules mare, has sentit molts que s'hagin curat amb tot això?

-Realment no, però sí que se'n sent més a parlar en els mitjans de comunicació.

Clar, però perquè vosaltres ho esteu vivint en aquest moment. Als anys 90 se'n sentia molt a parlar de la teràpia gènica. El *boom* que hi va haver sobre que podia ser una tecnologia revolucionària per tractar malalties va ser anterior a vosaltres. En canvi, de les cèl·lules mare vosaltres n'heu sentit a parlar perquè és molt més recent. Vosaltres no havíeu ni nascut quan la teràpia gènica es començava a gestar. Es va anar desenvolupant, i a part van haver algunes situacions que van obstaculitzar el procés, ja que es van induir algunes leucèmies. Però ara ja hi ha bastants casos de nens que s'han curat amb teràpia gènica. I bé, vosaltres sabreu si esteu mirant la malaltia del SCID per exemple, que el tractament que se li fa primer de tot en un nen d'aquests és un trasplantament de medul·la. Però els trasplantaments de medul·la necessiten tenir un donant histocompatible, si no tenen un donant histocompatible el risc és molt alt, de fet hi ha un 25% de mort associada quan el donant no ho és. Actualment la teràpia gènica en aquests casos està com a segona línia de tractament.

-Per tant la primera opció que donen als pacients és el trasplantament de medul·la.

Exacte, el trasplantament sempre hi quan tinguin un donant que sigui histocompatible. Si no hi és, passa a la teràpia gènica, això actualment. Però ara hi ha un estudi publicat en que uns grups han comparat quins són els resultats de fer un trasplantament haploidentí respecte la teràpia gènica i estan veient que la reconstitució del sistema immune és molt millor amb la teràpia gènica que no amb un trasplantament. Això vol dir que és probable que d'aquí un temps la teràpia gènica pugui ser la primera línia de tractament per aquests nens. De moment no, ja que tots els sistemes de control de seguretat i regulació tenen el seu ritme.

-Després de modificar genèticament unes cèl·lules de llevat hem pogut comprovar la dificultat del procés. Les cèl·lules de llevat s'han de preparar perquè puguin acceptar el nou ADN. En el cas de la teràpia gènica, els pacients també cal preparar-los d'alguna manera?

La teràpia gènica, comencem per aquí, quan es va aplicar als pacients hi havia dos tipus d'estratègies, la que es diu *in vivo* i la que es diu *ex vivo*. *In vivo* vol dir, que tu prepares l'ADN dins d'uns vectors determinats, i l'injectes directament en el pacient, a l'òrgan que et sembla o de forma sistèmica o el que sigui, en funció de la malaltia. En el cas d'aquestes malalties que vosaltres esteu investigant, s'aplica la teràpia *ex vivo*. *Ex vivo* vol dir que s'obtenen les cèl·lules del pacient i en el laboratori es posen en contacte amb aquest ADN, i després aquestes mateixes cèl·lules es reinfonen una altre vegada en el pacient.

-Llavors no cal preparar el pacient, no? Només cal que les cèl·lules que s'extreuen es tractin.

Exacte. Hi ha algunes malalties que sí que s'ha de preparar el pacient a través d'uns tractaments que en diuen de condicionament, que solen ser un tipus quimio, un citotòxic, per matar una mica les cèl·lules que tenen, ja que d'aquesta manera les que tu els hi poses puguin niar allà. Sinó, hi ha una competició molt gran i no tenen espai. Però, en alguns casos, i per exemple en aquesta malaltia en concret (SCID) això no es fa, perquè poses el pacient massa en risc, és a dir, ja té el sistema immune prou afectat com si tu a més a més encara li dones un tractament agressiu per baixar-li més les defenses, podria ser que això comprometés la seva supervivència. Amb el qual, en aquest cas en concret el pacient no se li fa cap preparació, és a dir, l'únic que se li fa és obtenir cèl·lules a través de la sang perifèrica i aquestes cèl·lules es purifiquen en el laboratori, es modifiquen i llavors se'ls hi reinfonen.

-I els dos mètodes tenen la mateixa eficàcia?

Tot depèn de la malaltia. Si tu pots fer *ex vivo* sempre és més segur, perquè ho tens molt més controlat, és a dir, *in vivo* tu poses al pacient l'ADN que t'interessa, que pot distribuir-se a les cèl·lules que tu vols i a vegades a les que no vols. En canvi, de l'altre manera només entrarà en aquelles cèl·lules que tu has extret, has modificat, i tornes a introduir. Fins i tot, el sistema immunitari no té una reacció en

contra de l'ADN que tu has posat perquè el que el sistema veu són les cèl·lules del propi pacient, mentre que quan tu estàs administrant *in vivo*, sí que pots tenir un efecte de rebuig contra el que estàs administrant.

-Sabent els efectes secundaris que pot provocar el fet d'utilitzar virus, perquè és el mètode més utilitzat? No seria més prudent desenvolupar un mètode no viral?

Tot això ha anat evolucionant i aquí hi ha un tema d'eficiència que és molt important. Els virus com ja sabeu, una cosa que saben fer és entrar dins la cèl·lula i introduir-hi el seu material genètic. La teràpia gènica fonamentalment el que fa és modificar aquests virus de manera que ara a més de portar el seu genoma portin el gen que tu vols. I solen ser molt eficients en modificar les cèl·lules que a tu t'interessen. Totes les estratègies que s'hagin desenvolupat fins ara que no estiguin basades en virus són molt poc eficients. Perquè tu pugis corregir un defecte necessites un percentatge de cèl·lules bastant alt que hagin incorporat el nou gen. Els sistemes basats en liposomes, en polímers o en nanopartícules, de moment la tecnologia està en el punt que amb això aconseguixes molt poques cèl·lules modificades, és tan poc eficient que no pot aportar un benefici en aquests moments.

Cal dir que depenent de la malaltia s'utilitzen un tipus de virus o uns altres, és a dir, aquestes malalties que volem tractar *ex vivo*, que obtenim les cèl·lules del pacient, que les modifiquem..., aquestes cèl·lules evidentment quan nosaltres les cultivem al laboratori s'estaran dividint. Si volem que es conservi aquest gen que hem incorporat, s'ha de poder integrar en els cromosomes de la cèl·lula, perquè sinó quan la cèl·lula es divideix es perd el gen. Hi ha virus que el que fan és quedar-se en el nucli de la cèl·lula de forma episomal, on la informació es queda al nucli però no s'integra en els cromosomes. Això està molt bé si arriba a cèl·lules que són terminantment diferenciades, cèl·lules que després ja no es divideixen més. Però quan tu vols que el gen entri en una cèl·lula que s'anirà dividint, quan la cèl·lula es divideix, la membrana nuclear desapareix i dona lloc a dues filles, una l'incorporarà però l'altre no l'incorporarà. Amb el qual a base de varies divisions el gen s'anirà diluint, i no ens interessa perquè perdríem l'efecte del nostre gen. Per tant, necessites utilitzar el que s'anomenen virus integratius, que t'integren el material genètic en el genoma de la cèl·lula.

La tecnologia que hi havia fins fa poc, permetia només una integració aleatòria, vol dir que allà on trobava un “forat” s’inseria. Els primers casos que es van fer es va veure que sobretot s’integrava en llocs on hi havia una transcripció molt activa i que moltes vegades era al costat d’uns gens que normalment estan silenciats, i si es col·locaven aquestes seqüències al costat, s’activaven i induïen a la formació d’un tumor.

Però això era degut a que aquests virus, de la manera que estaven dissenyats perquè poguessin expressar el gen que nosaltres volíem corregir, tenien unes seqüències determinades en el seu genoma, i aquestes eren les que actuaven com a activadores d’aquests tumors. El que s’ha fet ha sigut una nova generació de virus on aquestes seqüències s’han eliminat. I des que s’han generat aquests nous virus que se’ls anomena *Selvin Activator Virus*, no hi ha hagut cap cas de leucèmia. No ho sé si ni pot haver o no, però hi ha bastants pacients tractats i des de que s’han eliminat aquestes seqüències no s’ha donat cap més cas. Per tant d’alguna forma s’ha trobat quin és l’origen del problema.

-Hem vist que a l’hora d’inserir els gens es pot fer per adició (on no treus el gen defectuós) o bé per recombinació homòloga. En el cas del SCID quina de les dues possibilitats s’utilitzaria?

Actualment a nivell de laboratori, a nivell preclínic, nosaltres aquí ho estem fent (IDIBAPS) amb cultius etc, sense arribar al malalt, s’estan desenvolupant les tècniques possibles per fer una recombinació homòloga. Però per poder fer la recombinació homòloga vol dir que tu has d’anar fins on tens el gen incorrecte i provocar-hi un tall. Aquest tall ha de ser molt selectiu, és a dir, només pot ser allà i no en un altre lloc, i llavors introduir a la cèl·lula el casset de recombinació i substituir-lo pel gen defectuós (que es produeixi la recombinació). Això quan tu ho fas aquí al laboratori és possible, però aquests enzims que tallen de moment no són tan segurs com per només tallar en aquest lloc. Són capaços d’anar a aquest lloc però a vegades també se’l poden unir en algun altre punt i provocar-te un altre tall. Mentre no siguem capaços que aquests punts que necessitem tallar siguin únics i exclusivament al lloc on volem, la recombinació homòloga no anirà a la clínica, per tant això és una tecnologia que s’està desenvolupant. Però no hi ha assaigs clínics per fer la recombinació homòloga, el que s’està fent fins ara és inserir al genoma cel·lular el gen que a tu t’interessa sense treure el que et

provoca la malaltia.

-Es preveuen efectes secundaris a llarg termini per a aquells que han estat tractats amb Teràpia Gènica?

Bé, a aquests pacients se'ls va seguint constantment. En aquests moments, per exemple per al síndrome de la immunodeficiència combinada severa, els primers que es van tractar va ser fa 16 anys i actualment estan perfectes. És a dir, portem 16 anys, durant aquest temps no s'ha vist en principi cap efecte secundari greu, al contrari, aquests nens poden anar a l'escola i fan vida normal. Tenen el seu sistema immune, no probablement al nivell d'una persona totalment sana, però suficientment bé per poder fer una vida normal.

-Quin factor determina que una malaltia es pugui tractar amb Teràpia Gènica i l'altre no? Pel que hem vist, les malalties monogèniques són les úniques que es poden tractar. Però per exemple el càncer també es tracta amb aquest procediment i està determinat per més d'un gen.

En el cas que estem treballant nosaltres aquí als laboratoris, l'abordatge que tenim sobre el càncer és per induir la mort de la cèl·lula. No és corregir un defecte, sinó provocar la mort de la cèl·lula tumoral. Per molt que hi hagi molts gens que estiguin provocant el càncer tu pots anar amb estratègies que siguin dissenyades per eliminar la cèl·lula. Per exemple, nosaltres utilitzem virus que quan han infectat una cèl·lula repliquen a dins seu, i quan volen sortir de la cèl·lula ells mateixos la lisen per poder sortir i infectar les cèl·lules del costat. Si tu aquests virus els modifiques de tal manera que això només ho puguin fer en el tumor estàs eliminant la cèl·lula tumoral i no estàs danyant les cèl·lules no tumorals.

-Per dir-ho d'alguna manera, aquest és l'abordatge que s'utilitza en els diferents tipus de càncer, no?

Sí, això seria una estratègia més aviat universal. Això, o pots modificar aquests virus perquè indueixin les cèl·lules a morir més fàcilment, per diferents mecanismes que tenen les cèl·lules de morir.

-Quins són els inconvenients més importants que hi ha en aquests moments?

En teràpia gènica cada malaltia és un món diferent. Els problemes relacionats amb les cèl·lules sanguínies o el sistema hematopoètic, la teràpia gènica està avançant molt ràpid, com el cas del SCID o moltes altres immunodeficiències primàries, hi ha molts assaigs clínics. S'ha après a cultivar aquestes cèl·lules, perquè s'han descobert uns vectors que funcionen bé. Altres malalties que afecten a molts òrgans diferents (multisistèmiques) el problema està en com ho distribueixes, és a dir, com pots arribar als diferents òrgans. És una dificultat. Uns virus poden arribar molt bé a cèl·lules musculars, uns altres al fetge, però si tens un problema que t'afecta a més d'un conjunt té més complexitat.

El tema de seguretat sempre està allà, intentar que els vectors siguin el més segurs possibles. Però bé, el tema està en tenir els vectors ideals per poder administrar el gen.

Hi ha moltes malalties que no són degudes a un únic gen sinó que com heu dit abans, n'afecta a molts i s'han de buscar altres estratègies que no necessàriament siguin suplementar aquell gen sinó fer expressar una molècula que pugui ajudar a que el pacient millori.

Per exemple, la diabetis. Es basa en la destrucció de les cèl·lules beta del pàncrees i el que fan els diabètics és administrar-se insulina. Hi ha científics que estant intentant produir insulina a través d'un vector de teràpia gènica. Però aquesta insulina ha de ser molt finament regulada perquè no pots tenir una expressió constant d'insulina sinó que necessites que respongui a la glucosa. Depèn dels dissenys dels vectors que puguis fer.

-Llavors també hi ha la possibilitat de tractar aquestes malalties que afecten més d'un gen, però des d'un abordatge diferent.

Sí, hi ha gent que està treballant-hi, com per exemple en el cas de la diabetis. No estaria limitada a les malalties monogèniques, sinó que qualsevol malaltia amb la qual tu pensis que la producció d'una proteïna pot ser beneficiosa. En aquest cas la insulina, però en un altre cas per exemple, un factor de creixement perquè indueixi la regeneració d'unes cèl·lules x. Sempre es tracta de com regular aquesta expressió, perquè només la necessites en un moment donat, aquest és el control que es necessita.

5.2. Miguel Chillon

El dr. Chillon va néixer a Barcelona l'any 1966.

Doctor en Genètica a l'Hospital Duran i Reynals i a la Universitat de Barcelona, 1994. Va guanyar el Premi Nacional de Genètica Humana de l'Associació Espanyola de Genètica Humana l'any 1995. Becari post doctoral a la teràpia gènica per a la fibrosi quística, en la Medicina Interna del Departament de la Universitat d'Iowa, EUA (1994-1997). Becari post doctoral en la teràpia gènica (2000-2001) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).



Actualment és professor d'Investigació ICREA de la UAB des de l'any 2001 i és científic responsable de la Unitat de Producció de Vectors, una plataforma tecnològica per a produir vectors virals, des de 2004. També és membre del Comitè de Bioseguretat de la UAB des de 2006. Cofundador de Nanotherapix, empresa spin off en biotecnologia, en 2009. Ha publicat més de 60 articles i 5 patents generades en vectors virals.

-La Teràpia Gènica a la dècada dels 90 era la gran promesa del futur. Per què en més de 25 anys no hi ha hagut un gran avanç? Per exemple en el cas de les cèl·lules mare, sí que hem sentit més a parlar-ne.

La resposta és molt complexa, no se n'ha sentit tant a parlar per qüestions econòmiques, de legislació i tècniques.

En els 90 era la gran promesa del futur perquè tot just s'estava desenvolupant la tecnologia i el potencial que tenia era molt gran. Però més endavant, es va veure que hi havia una sèrie de problemes que en un principi no s'havien vist i que calia solucionar. Un dels problemes era que quan tu posaves un vector (viral) dins l'organisme, l'organisme el reconeixia com una cosa estranya i creava tot un seguit de defenses contra aquest vector, que podien eliminar les cèl·lules tractades, ja que les reconeixia com infectades. També podia passar que el teu cos hagués estat exposat abans a aquests vectors de teràpia gènica, ja que per exemple n'hi ha alguns que deriven del refredat, i que el teu organisme ja hagués creat uns anticossos. Quan es posaven aquests vectors de teràpia gènica

modificats per curar-te, l'organisme els reconeixia i els atacava abans d'arribar a les cèl·lules diana. Un altre problema que va sorgir era que, en el cas dels virus que s'integren dins del genoma, inicialment es pensava que per la grandària del genoma humà, els vectors s'integrarien en llocs sense importància. Però es va veure que en el síndrome de la immunodeficiència combinada greu s'integraven a prop d'un tipus de gens anomenats **oncògens**, que si s'activaven donaven lloc a tumors. Això comportava que s'haguessin de manipular els virus per tal que no s'integressin a prop d'oncògens. En resum, hi havia tot un seguit de problemes tècnics que amb el temps s'han anat solucionant.

En la qüestió legislativa, el fet que hagi de modificar, reprogramar, la informació genètica de les teves cèl·lules, des del punt de vista dels comitès d'ètica és un tema molt delicat. Estaria ben vist si fos només i exclusivament per tractar malalties, però la tecnologia que fas servir per curar malalties pot ser la mateixa que utilitzis per provocar o induir que tinguis una sèrie de característiques o de guanys, ja sigui a nivell muscular o visual per exemple, que et representi tenir un guany de funcionalitat. Per tant, aquells que volguessin tenir els ulls de color verd, per posar un exemple, se'ls podrien canviar si se sap quin és el gen que dóna el color als ulls. Per això, en qüestions d'estètica que no tinguin res a veure amb una malaltia mortal, hi ha molts problemes per tal que et permetin arribar a desenvolupar aquesta tecnologia perquè es pot traspasar molt fàcilment a innovacions que no serien correctes. Encara que tinguis molt clar que vols curar una malaltia que no té cura, que no hi ha alternatives, els comitès de regulació i d'ètica posen moltes traves. I només deixen línies d'investigacions per a tumors molt malignes o malalties hereditàries que siguin mortals (no per a aquelles en que pots estar 20 anys malvivint però no et provoquen una mort ràpida). Només passen i s'aproven al cap de molts anys aquests tractaments, i et demanen tantes coses que fa que a nivell de farmacologia, de les indústries farmacèutiques que han de produir aquests vectors virals, sigui extremadament car.

Ara és quan passem a la part econòmica. Per exemple, per produir un virus modificat provat a cinc, deu o quinze pacients, només per veure si funciona, poden ser des d'un milió a deu milions d'euros. Cada assaig clínic que es fa, pot durar entre 2, 3 i 4 anys, independentment de tots els permisos regulatius que tinguis. Això significa que per a passar les diferents fases abans de la comercialització del producte pots estar entre 10 i 15 anys. Això es deu al fet que

cal observar la duració de la funcionalitat del virus, perquè pot ser que el vector introduït deixi de ser eficient en un any. Llavors, tu com pots estar segur que el teu tractament és eficient o no? Per això, li has de donar prou temps per poder-ne veure l'eficiència (assaigs llargs). Tot això en quant a la durada, però econòmicament, quan has de tractar a l'última fase un grup de 100 o 200 pacients, et pot costar perfectament 50, 100 o 200 milions d'euros. Aquesta quantitat econòmica per a un grup científic és molt difícil d'aconseguir, i llavors necessites anar fent moltes xerrades i parlar amb grans indústries farmacèutiques per tal que et donin els diners. Això tampoc es fa d'un mes per un altre, són molts diners, inversions molt grans i també comporta molt de temps.

En resum, des de que comences fins que acabes poden passar 20 anys, però això només passa en teràpies avançades, que serien la teràpia gènica, les cèl·lules mare i els teixits regeneratius. Quan es tracta d'una molècula senzilla (per exemple l'aspirina), el període de temps és molt més curt i els costos són més baixos, ja que els comitès ètics no demanen tantes mesures, perquè no significa reprogramar la teva informació genètica i que aquesta reprogramació pugui passar a la descendència. Si tu comences a jugar amb la informació genètica de l'espècie humana, a saber el que ens podem trobar al cap d'un temps. Per això, s'ha d'anar amb molt de compte i ha d'haver-hi molts controls. Llavors, per què tot el procés triga tant? Perquè com he dit, hi ha problemes tècnics, de legislació i econòmics.

-Sabent els efectes secundaris que pot provocar el fet d'utilitzar virus, perquè és el mètode més utilitzat? No seria més prudent desenvolupar un mètode no viral, o uns virus que no impliquessin l'aparició de tumors?

Depèn. Ara posarem un exemple.

En el teu cos, exceptuant neurones i cèl·lules musculars, totes les teves cèl·lules es van renovant. Algunes molt ràpidament, com les intestinals que entre 3 i 7 dies ja s'ha renovat tot l'epiteli intestinal, i altres triguen un any, uns mesos o unes setmanes. Si tu amb un virus no integratiu entres en alguna d'aquestes cèl·lules ja diferenciades, a la teva cèl·lula corregida s'estarà expressant el gen terapèutic, funcional, durant el temps de vida de la cèl·lula, si és una setmana, doncs durant una setmana funcionarà i després desapareixerà. Com que tu has posat un virus no integratiu en el teu cos, després del temps que hagi trigat la cèl·lula en

renovar-se s'haurà de tornar a introduir un altre virus perquè les cèl·lules que han tornat a néixer siguin corregides. Però com que tu ja li has posat el virus abans, es produeix un efecte vacuna, el teu cos reconeix el virus, hi ha defenses, i quan el poses en sang un altre vegada és reconegut i inactivat. Per això s'ha de buscar una manera que el virus s'integri dintre del genoma d'aquelles cèl·lules que encara no estiguin del tot diferenciades i per tant que es puguin replicar varies vegades i transmetin el gen corregit. És per aquest motiu que es busca un virus integratiu. Els virus no integratius només funcionen per cèl·lules que ja no es renovaran, com les del cervell o del múscul, totes les altres s'acabaran renovant, i el gen es perdrà.

-I què me'n diu dels *Selvin Activator Virus*?

Des de que es va produir aquella aparició de tumors en el síndrome de la immunodeficiència, hi ha dos canvis que s'han fet. Un és que enlloc de fer servir els virus que s'utilitzaven fins ara, s'han fet servir uns de molt semblants als retrovirus i als lentivirus normals, com el virus del sida, que s'ha modificat per tal que sigui innocu. Se sap que també s'integra però no de la mateixa manera que ho feien els virus que es van utilitzar en els primers assaigs d'aquesta immunodeficiència que tracteu. El segon canvi que es va fer era que si algun d'aquests virus encara s'integrés en un lloc que no toqués, se li posaria una segona qüestió de seguretat la *Selvin Activating*. Aquesta seqüència significa que el virus es comporta d'una manera mentre està dins de la càpsida viral, però en el moment que s'integra es perd una part del seu genoma, i que un cop integrat ja no pugui sortir de la cèl·lula ni activar gens propers (oncògens). És una modificació que provoca que no pugui activar altres gens.

-Es preveuen efectes secundaris a llarg termini per a aquells que han estat tractats amb Teràpia Gènica?

Això fins que no passin els anys necessaris no se sap (5, 10, 15 anys), però això passa també amb moltes tecnologies que es fan servir en medicina normal. Per exemple, hi ha molta gent que diu que si prens aspirines durant molt de temps pots tenir problemes de coagulació. O per exemple, aquelles persones que pateixen del peu bord, normalment es corregeix per cirurgia i aquests peus van bé durant 15 o 20 anys; però s'ha vist que si enlloc de fer cirurgia els poses en un

guix, que és molt més lent, però el deixes corregir tot sol, després de 40 anys els pacients tenen el peu molt bé mentre que els que s'havien fet cirurgia, tenen problemes després de 15 o 25 anys. El que vull dir és que cinc anys és un termini de temps llarg, però qui et diu que no pots tenir efectes secundaris en 10 o 20 anys. Quan un treballa en qüestions com aquestes, inclosa la teràpia gènica, és un dubte que surt, és una molt bona pregunta. Què fem els investigadors per evitar això? Hi ha varies estratègies, una és posar promotors que siguin induïbles, no es fa servir molt perquè hi ha altres complicacions, però la idea sempre és aquesta. De manera que tu puguis posar alguna cosa al menjar o al beure que indueixi que s'activi o inactivi el teu gen. D'aquesta manera tu tens el gen en el teu cos i si hi ha un desconeixement sobre algun factor, una de les opcions és: per si de cas, donem alguna cosa que posi el gen en *off*. O bé, si tens un problema i no saps si és degut al gen, és bo que tu puguis posar-lo en *off*, per assegurar-te que no és provocat pel gen i després el puguis tornar a posar en *on*. L'altra cosa que es busca que és més intel·ligent encara, és treballar amb el mateix promotor que fa servir el teu gen amb el teu cos. Per exemple, si tu tens una malaltia com la diabetis i tens un problema amb la insulina, l'objectiu seria utilitzar el mateix promotor de la insulina perquè reguli de forma natural la teva producció d'insulina. Però això implica conèixer molt bé els promotors, que no sempre és fàcil, i implica que els promotors tinguin una mida petita perquè els puguis posar dintre del teu virus, i no sempre es possible. Tot i així s'estan buscant solucions a aquests problemes.

-En els últims assaigs realitzats, algun pacient ha desenvolupat algun tipus de tumor?

El que jo tinc entès és que els tumors van sortir amb els primers assaigs. El canvi d'estratègia no n'ha fet sortir més o si n'hi ha hagut no s'han pogut associar a aquest tractament, ja que de tumors en van sortint independentment. Els tumors van ser provocats perquè el virus es posava just al costat d'un *oncogen* i aquest *oncogen* s'activava formant un tumor. Amb els altres casos, que jo tingui entès, no ha passat, i això de fet és un èxit.

-Quins són els inconvenients més importants que hi ha en aquests moments?

Depèn de per quina malaltia. Per al SCID, que s'està tractant bastant bé, inconvenients n'hi ha pocs. Entre els *Selvin Activator* i el canvi de virus els problemes que hi ha són molt menors. En quant a les altres malalties, cada malaltia té la seva dificultat o les seves característiques pròpies. Com que no existeix un tractament per a totes, has de decidir quin tipus de fàrmac o quin tipus de virus necessites per a cada malaltia en particular.

En el cas del síndrome de la immunodeficiència combinada severa, en quina fase preclínica es troba?

En aquest cas, com que no hi ha gaires pacients segurament no arribis a la fase comercial. Per exemple, hi ha una malaltia que a Espanya només hi ha 7 persones afectades i a França n'hi ha set o vuit més, és a dir, que n'hi ha molts pocs. Tu quan fas els assaigs, si en la primera fase preclínica tractes set o vuit pacients ja has tractat tots els malalts d'Espanya, i quan facis la segona fase hauràs tractat tots els d'Europa. Amb el qual no té sentit arribar a la fase comercial perquè ja no tindràs pacients. Aquestes fases es fan pensant en malalties que són molt més grans. Per exemple, en la fibrosis quística, en la que 1 de cada 25 persones és portadora i afecta a 1 de cada 2500 persones; és a dir, malalties que són molt més freqüents. Però amb el SCID són tant pocs els pacients que en les fases preclíniques ja els has tractat a tots.

-Després de modificar genèticament unes cèl·lules de llevat hem pogut comprovar la dificultat del procés. Les cèl·lules de llevat s'han de preparar perquè puguin acceptar el nou ADN. En el cas de la teràpia gènica, els pacients també cal preparar-los d'alguna manera?

Primer, si el procés és més complicat en humans és en part, per l'accés a les cèl·lules. Perquè accedir a cèl·lules de cervell per exemple, implica que has d'arribar fins allà o tenir un vector que pugui travessar la membrana hematoencefàlica. Si vols anar a cèl·lules musculars, injectes i ja està, una vegada el gen a arribat al nucli de la cèl·lula és igual el tipus de cèl·lula. La qüestió és transportar el teu gen terapèutic de manera que ni es degradi ni es perdi abans d'arribar al nucli. El que fa un virus o un vector no viral és protegir el

gen de la seva degradació o de la resposta immune, i un cop dins la cèl·lula dirigir-lo des de la membrana fins al nucli, però una vegada està dins és independent del tipus de cèl·lula.

Segon, vosaltres segurament veu fer servir un sistema no viral, o bé per xoc tèrmic o posant un compost catiònic o alguna substància que envoltés el plasmidi i li permetés entrar dins el nucli. A nosaltres ens agraden més els vectors virals. Per exemple, si vols fer un xoc tèrmic en teràpia gènica, en molt pocs tipus de cèl·lules ho podries fer, les musculars en serien unes. Tu poses unes plaquetes o uns elèctrodes i dones un xoc elèctric per a que les membranes de les cèl·lules s'obrin, facin uns porus i l'ADN pugui entrar. Per alguns tipus de cèl·lules es pot fer aquest tipus de procediment, però per exemple, no pots donar descàrregues elèctriques al cervell o al cor. *Ex vivo*, és un procediment que també es pot fer en alguns tipus de cèl·lules, normalment per hematopoètiques, perquè tu no pots extreure una biòpsia de cervell o no és recomanable fer-ho de pulmó, perquè al tornar-les a introduir hi pot haver complicacions. Si són *ex vivo*, sí que pots agafar les cèl·lules, posar-les en un plat de cultiu i allà tractar-les. Però tu finalment voldràs tornar-les a posar dins l'organisme. En el moment que tu tens les cèl·lules fora del cos estan en estrés i poden canviar el seu perfil i la seva expressió, i com més coses els hi facis, més canvis tindran, de manera que quan les tornis a introduir no es comportaran com abans d'extreure-les. Quina és una de les coses més innòcua a priori per a les cèl·lules? Els virus o alguns nanocompostos. Per què? Perquè són organismes preparats per entrar a les cèl·lules, «escapant» dels sistemes de detecció, i no canvien el perfil d'expressió de les cèl·lules. Quan tu treballes amb humans, per eficiència, es prefereix treballar amb virus, ja sigui per *ex vivo* i sobretot per *in vivo*, ja que és molt més fàcil introduir el virus en sang i que aquest vagi buscant la cèl·lula diana, que si has d'anar posant elèctrodes o substàncies catiòniques, que a més costaria molt de legalitzar.

Els virus són els més eficients. A dia d'avui si un mira què és el que es fa servir més en teràpia gènica en humans, hi ha diferents pàgines web on es poden buscar, la gran majoria són sistemes virals, i si són no virals, tenen estratègies de virus o algunes proteïnes virals per dirigir-los a les cèl·lules diana. En resum, excepte alguns nanocompostos la gran majoria són sistemes virals.

-Llavors, no seria més eficient el procediment *in vivo*? Tenint en compte que si tu extreus les cèl·lules de l'organisme les tens en un estrés constant.

Si les infectes amb un virus no tens perquè. És el que passa amb el síndrome de la immunodeficiència: tu selecciones les cèl·lules que vols, les modifiques, les reprogrames amb els virus i les tornes a injectar, i al cap i a la fi hi ha pocs canvis. Quins avantatges presenta l'*in vivo* o l'*ex vivo*? L'*ex vivo* per començar, només es pot fer amb cèl·lules hematopoètiques, avantatge: al tractar les cèl·lules en un plat i tractar-les amb el virus, el virus que no ha entrat el pots eliminar i no el reintrodueixes amb les cèl·lules a l'organisme. Amb el qual l'organisme no te'l detecta i no genera una resposta immune contra el virus. És molt més segur treure els virus que no et facin falta i introduir només les cèl·lules infectades. Quan tu poses el mateix virus *in vivo*, aquest infectarà majoritàriament les cèl·lules diana, però també n'infectarà d'altres, i això pot provocar que generi una resposta involuntària, com la sobre expressió d'una proteïna. Sempre és més segur fer-ho *ex vivo* perquè poses menys càrrega vírica, pots eliminar els virus restants i poses les cèl·lules que vols. És més complexa, ja que t'han de viure les cèl·lules i les has de tornar a introduir, però te uns components de seguretat que són importants a tenir en compte.

-Quin factor determina que una malaltia es pugui tractar amb Teràpia Gènica i l'altre no? Pel que hem vist, les malalties monogèniques són les úniques que es poden tractar.

Econòmic. Per dir-ho d'una altra manera. Hi ha dos tipus de famílies de fàrmacs: els químics i els biològics. Els químics són molècules que quan estan en contacte



Fig. 27. Bioreactor d'una indústria farmacèutica

amb la cèl·lula provoquen que la cèl·lula tingui una sèrie de canvis en quant a l'expressió de certes proteïnes. Els fàrmacs biològics, formats per proteïnes o parts d'aquestes, són produïts per un bioreactor (cèl·lules humanes que produeixen el fàrmac a nivell industrial) d'on les indústries farmacèutiques n'agafen les proteïnes que s'han format en el bioreactor, prenen un extracte i el

posen en uns vials per a la seva comercialització. El que fa la teràpia gènica és agafar el gen que utilitzen les indústries farmacèutiques per als bioreactors, per tal que siguin les cèl·lules del teu organisme qui sintetitzin les proteïnes. El fàrmac serà el mateix, però no estarà produït per un bioreactor. Què és més car, produir la proteïna amb un bioreactor i obtenir grans dosis o produir un virus i injectar-li al pacient? A la curta sembla que produir el virus és més barat, ja que tu només l'has d'injectar i ja tens per tota la vida l'expressió. Però la caracterització de bioseguretat del virus és tan cara que costa milions i milions d'euros, encareix tant el fàrmac que realment al final surt més barat utilitzar els bioreactors, ja que no s'utilitzen virus i tant el pacient com el doctor estan més segurs a l'hora d'utilitzar-lo. Llavors el cost serà 10, 20 o 50 euros, però no 20 mil o 30 mil euros, és a dir, és una qüestió econòmica. Però a nivell farmacèutic, què interessa més a les companyies, un fàrmac que tu puguis donar una vegada i ja estiguis curat per tota la vida o un tractament on t'hagin de donar dosis de manera repetida? Tot i que és molt fort, realment aquestes indústries aposten pel tractament continuat.

En quant a les malalties poligèniques, quan tu tractes una malaltia poligènica, el que fas per exemple, no és tractar la malaltia sinó que es basa en adormir la via de senyalització del dolor. Hi ha malalties autoimmunes que són molt complexes, on pots anar a incidir al punt final de la mutació, de manera que encara que hi hagi molts gens defectuosos si tu modifiques l'últim, pots obtenir un bon resultat. El que vull dir és que hi ha moltes estratègies que impliquen que no hagi de modificar tots els gens. Però realment, tot és una qüestió econòmica.

-Hem vist que a l'hora d'inserir els gens es pot fer per adició (on no treus el gen defectiu) o bé per recombinació homòloga. En el cas del SCID quina de les dues possibilitats s'utilitzaria?

En veritat, no hi ha cap estratègia *in vivo* en humans que es pugui canviar per recombinació. En cultius cel·lulars sí que s'ha aconseguit però res més. Ara hi ha una tecnologia nova que ho està investigant per fer-ho *in vivo*. Però primer cal tenir en compte que el genoma humà són 3 mil milions de parells de bases, per poder fer una recombinació homòloga tu has de tenir una molècula d'ADN dins d'un vector que sigui capaç d'anar al cromosoma indicat entre aquests milions de bases, desenrotllar el cromosoma, reconèixer la seqüència indicada del gen, forçar la unió provocant un tall i canviar-se. De tot això, el més complicat de tot és

l'especificitat, reconèixer la seqüència. Tant complicat, que amb les millor armes que tenim avui en dia que són els virus integratius perquè tenen milions d'anys d'evolució, no es pot controlar a on va. Com es pot afavorir això? *In vitro*, tu treballes amb unes línies cel·lulars que no són línies primàries, són línies estables que ja tenen moltes mutacions cromosòmiques per les diferents modificacions que se'ls hi ha fet i forces el sistema per tal que alguna funcioni dins de la cèl·lula. Això només ho pots fer en cultius, amb unes cèl·lules i unes condicions molt determinades. *In vivo* ja us puc assegurar que no hi ha manera, tot i que hi ha una tecnologia que ara sembla que podria realitzar això *in vivo*.

-Creu que la teràpia gènica s'hauria de limitar a uns casos molt concrets perquè en un futur no se'n faci un ús indegut?

En un futur molt llunyà això serà una tecnologia molt barata. El problema no serà que la gent es vulgui canviar el color dels ulls. Total, avui en dia també et pots fer un diagnòstic prenatal per si vols nen o nena perquè a la família hi ha una malaltia associada al cromosoma X o al cromosoma Y, per tal que no et neixi el fill amb una malaltia mortal, això ja es pot considerar una selecció. El problema no és que tu canviïs el gen *a* de color blau pel gen *b* de color verd perquè això són modes, el problema està en que tu comencis a canviar l'ordre i el nombre de gens que tens. Si posem per exemple la hormona de creixement, tu podries donar-li un promotor més fort o donar-li dues còpies del gen per tenir-ne més quantitat, això voldria dir que tindries un home molt més gran. Això ja canvia el genoma de manera radical, no perquè et canviïs el color dels ulls, que és el que crida més l'atenció, l'estètica, aquest és el menor dels problemes. El que canvia molt és que tu canviïs realment el nombre o l'ordre dels gens humans. Això canviaria l'espècie, podries fer una espècie nova, que fins i tot podria dificultar l'encreuament entre els humans. Perquè en el moment que tu tens cromosomes amb parts noves, potser no es recombinen bé o no fan correctament la mitosi. En un país començaran fent una cosa i en un altre país una altra i al final tindràs milions de variants del genoma humà.

-Això també es podria relacionar amb la teràpia gènica germinal o la teràpia gènica somàtica. Si fas la teràpia germinal si que podria transmetre's el canvi a les següents generacions.

Sí, però quan poses un virus en sang, com pots estar cent per cent segur que no infecta també les cèl·lules germinals? I ara perquè no es vol fer amb cèl·lules germinals, però qui diu que no es pugui fer? Realment és molt més senzill perquè és un procediment *ex vivo*, tu agafes els òvuls, els manipules i fertilitzes in vitro. I la tecnologia hi és, qui et diu que algú no ho pugui fer? Això ja si que a nivell d'ètica és molt complexe, és tant potent l'eina que ara estan posant molt de pes per evitar que passi, com amb la radioactivitat, que al poc de ser descoberta ja es va fabricar la bomba atòmica, i això és tant o més potent. Aquesta manipulació pot canviar totalment a nivell genètic l'espècie humana. O al revés, que facis uns virus que puguin anar destinats a determinats tipus cel·lulars o determinats receptors que estiguin més presents en un tipus de població que en una altre. En un futur es podrà fer tot, per això és un tema molt delicat. És tant potent que la gent té por o n'hauria de tenir.

-Però realment la teràpia gènica no és una cosa que tothom conegui. Vam fer unes enquestes al nostre institut i al nostre poble sobre el nivell de coneixement de les diferents branques de l'enginyeria genètica, i vam poder observar que la majoria de la gent desconeixia que és la teràpia gènica.

Això no vol dir que no es treballi. A Espanya potser hi ha 50 o 60 grups treballant en el tema, però a tot el món potser n'hi ha cinc cents o mil. Que no sigui coneguda no vol dir que no hi hagi la tecnologia per fer-ho. És com la física quàntica, poca gent en sap però no vol dir que no estigui present. De fet, fa cosa de dos o tres anys van venir a preguntar-me uns del centre d'alt rendiment si existia el dopatge genètic. A nivell del Comitè Olímpic Internacional es pensava que hi havia algunes persones molt sofisticades que podien provocar-te amb teràpia gènica una hipertròfia muscular: et posen amb un vector un dels gens que augmenta la massa muscular i al cap d'un temps et desapareix i no queda rastre, és el teu propi gen, la teva proteïna i la teva informació genètica, simplement durant un temps li has posat més còpies amb un vector que et desapareix. Amb aquesta tècnica pots tenir més massa muscular, més resistència i fins i tot podries arribar a modelar els atletes d'alt nivell. Es fa? Jo diria que no, però sí que es pot

fer des de fa anys.

-Però això deu estar regulat per aquests controls d'ètica, no?

No, és igual que una droga, estan prohibides però la gent igualment les pren. Imagina't: si vosaltres mateixes vau poder fer una manipulació genètica amb llevats, i les eines son gairebé les mateixes, podríeu manipular molt tranquil·lament el genoma d'aquests plasmidis perquè en comptes d'introduir-los en llevats puguin entrar en cèl·lules humanes. Quan et podria costar això sent il·legal i sense passar cap control? 500 euros o menys, és a dir, molt poc. Fixeu-vos, vosaltres que sou estudiants ja teniu les eines per poder modificar cèl·lules, per tant per a professionals és molt fàcil. Ara bé, quan vols anar a curar malalties amb teràpia gènica i que tingui un efecte terapèutic ja és més complicat.

-I actualment es podria estar desenvolupant aquesta pràctica en el món olímpic?

Tècnicament es podria fer i des de fa anys. De fet, el Comitè Olímpic Internacional està darrere d'aquesta pràctica, està preocupat per si s'està desenvolupant. I això ja va sortir fa temps en una revista científica que si el dopatge genètic no era una realitat detectada igualment estava present. Gent que no tingui escrúpols i per diners hi podria accedir.

5.3. Jordi Barquinero

Es va llicenciar en Medicina a la Universitat Autònoma de Barcelona l'any 1982, i va acabar la seva residència en Medicina Interna l'any 1989. L'any 1992 va aconseguir un doctorat amb honors per la UAB. Va ser becari postdoctoral al *Fred Hutchinson Cancer Research Center* (Seattle, EUA, 1992-4). Juntament amb el Dr. Antonio Salgado, van rebre el Premi Boehringer Ingelheim al millor article sobre biotecnologia en medicina. L'any 2004 va ser president del Comitè Organitzador de la segona Reunió de la Societat Espanyola de Teràpia Gènica (SETGYC), de la qual és un dels membres fundadors.



La seva recerca s'ha centrat principalment en l'autoimmunitat i la teràpia gènica basada en cèl·lules mare hematopoètiques, i ha participat en diversos projectes nacionals i europeus relacionats amb aquests camps. També és coautor de més de 60 publicacions en revistes científiques, així com de diversos capítols de ciència popular o llibres científics.

Actualment està coordinant un projecte europeu sobre l'ús de cèl·lules mare pluripotents induïdes per modelar patògens i aspectes terapèutics de l'hemofília A. Des de 2009 és a més, vicepresident de la Societat Catalana de Biologia.

-La Teràpia Gènica a la dècada dels 90 era la gran promesa del futur. Per què en més de 25 anys no hi ha hagut un gran avanç? Per exemple en el cas de les cèl·lules mare, sí que hem sentit més a parlar-ne.

Perquè en aquell moment hi havia moltes expectatives posades, i normalment quan surt una tecnologia nova i els mitjans de comunicació i tothom diu que allò serà la gran revolució, la gent s'ho creu. I això ha passat no solament amb la teràpia gènica, si no que ja havia passat abans amb els trasplantaments. Els trasplantaments van tenir la mateixa història però 50 anys endarrere. Quan es van descobrir semblava que ho havien de curar tot, i la veritat és que van estar molts anys sent un desastre perquè la gent es moria. Et posaven un fetge o un ronyó i vivies uns mesos, el primer trasplantat de cor va viure hores, però era la gran promesa. Fins que no han passat 25 anys no s'ha anat coneixent el tema i millorant la immunosupressió, i ara els trasplantats ja tenen una esperança de vida d'uns 20 anys, però aquesta pràctica ha patit un procés molt lent, i amb la teràpia gènica ha passat el mateix. Al començament hi havia la idea i unes eines que teòricament ja podien servir, però en realitat eren unes eines molt primitives, els primers vectors que es van provar mirats des d'ara veus que allò tenia molt poques probabilitats de funcionar. Però la il·lusió va fer que semblés que aquesta tecnologia serviria per curar moltes malalties. Què ha passat, doncs? S'han anat trobant obstacles, pedres en el camí que s'han anat superant poc a poc. En un assaig que es va fer es va veure que la teràpia gènica provocava càncer, leucèmia, en els pacients tractats del SCID (cadena gamma), i això va parar la recerca i els assaigs que es feien durant molt temps. Després, es van investigar

nous vectors, vectors més bons i més segurs. Tot això ha derivat en un procés lent i ara comença una altra vegada de nou, no se'n sent parlar gaire però hi ha assaigs que estan funcionant força bé i han millorat molt respecte el que es feia abans. Probablement en el futur veurem moltes més coses perquè quan un nou tractament comença a funcionar ja s'aplica molt més a altres malalties i segurament d'aquí uns anys hi haurà un altre *boom* de la teràpia gènica.

-Quins són els inconvenients més importants que hi ha en aquests moments?

La teràpia gènica al començament es va aplicar a moltes malalties, cada especialista volia tractar la seva malaltia, però és veritat que no va funcionar casi bé res, i les úniques que van funcionar inicialment van ser les immunodeficiències. Aquest fet no era casual, quan tu modifiques les cèl·lules mare del moll de l'os que són les que donen lloc al sistema immune, la cèl·lula que has modificat té un avantatge selectiu respecte a les que no has modificat. Això vol dir que aquella cèl·lula pot proliferar millor perquè rep les senyals adequades per poder proliferar, i pot sobreviure i funcionar millor. Encara que tu en modifiquis molt poques, aquestes poques s'acaben convertint en moltes, mentre que les que no has modificat es van morint ràpidament. Per tant, les cèl·lules que has modificat proliferen molt, s'expandeixen i al final acaben desplaçant a les altres. Aquest avantatge selectiu que tu els hi estàs proporcionant només es dona en les immunodeficiències, amb les altres malalties no. I això és degut a que en el cas de l'ADA per exemple, l'enzim ADA també els hi serveix a les cèl·lules per sobreviure. El problema del dèficit d'ADA és que es tracta d'una malaltia tòxica, s'acumula un metabòlit que no es degrada i la cèl·lula que acumula molt d'aquest metabòlit es mor. Quan poses el gen ADA, quan corregeixes aquestes cèl·lules, ja poden degradar els metabòlits, ja no tenen aquesta toxicitat i per tant aquelles cèl·lules sobreviuen, mentre que les que no has modificat moren. En una altra malaltia, posem la hemofília que és una malaltia on hi ha un factor de la coagulació alterat, encara que tu corregeixis aquella cèl·lula no li dones l'avantatge selectiu, la cèl·lula li és igual fabricar un factor de la coagulació normal que un factor que estigui alterat o no fabricar-ne, de cara a la seva supervivència o a la capacitat de proliferar, no li presenta cap avantatge. Per tant només van funcionar bé les malalties en les que la modificació genètica que tu fas

proporciona un avantatge selectiu a la cèl·lula. Això és molt important, perquè explica el perquè en aquesta malaltia ha funcionat i en unes altres no.

-Sabent els efectes secundaris que pot provocar el fet d'utilitzar virus, perquè és el mètode més utilitzat? No seria més prudent desenvolupar un mètode no viral o utilitzar uns altres tipus de virus?

Aquestes leucèmies van aparèixer en un dels assaigs del SCID, en la variant de la deficiència de la cadena gamma. El perquè van aparèixer en aquesta variant del SCID i en les altres no, encara no se sap, perquè era un virus molt similar el que s'utilitzava, però el que sí que és veritat és que en el cas de la deficiència gamma el virus s'integra en el genoma de la cèl·lula. En un principi es pensava que aquestes integracions es farien a l'atzar, és a dir, que potser només un dels gens es col·locaria al costat d'un oncogen. Què passaria si possessis un gen del virus al costat d'un oncogen? Podria ser que el promotor del virus fos molt potent i pogués activar l'oncogen del costat. Això era un risc que teòricament tothom sabia que existia, però es pensava que seria un risc molt baix, perquè d'oncògens no n'hi ha molts i el genoma és molt gran. Però la veritat es que d'aquests nens amb els que es van fer els assaigs, diria que eren setze en total, va haver sis que van desenvolupar leucèmia, com un 30%. En canvi en el ADA, no va haver cap cas. Perquè en l'ADA no, i en la deficiència de la cadena gamma sí, no se sap. Però això realment té a veure amb el patró d'integracions que té el virus amb una malaltia o amb una altre, ja que el tipus de promotor del virus no és exactament el mateix en una malaltia o en una altre. També podria ser degut a les diferències que hi ha entre els gens, és a dir, per cada malaltia hi ha un gen diferent a canviar, potser les homologies de la seqüència d'un gen i l'altre, faci que un sigui més propens a integrar-se en un lloc o en un altre. La qüestió és que en l'ADA no hi ha hagut cap leucèmia, i de fet l'ADA, és un dels grans èxits de la teràpia gènica. I ara, crec que a partir de l'any que bé estarà comercialitzat aquest tractament.

-Pel que hem pogut veure, fins a ara la primera línia de tractament per a aquests nens és el trasplantament de medul·la òssia i després se'ls ofereix la teràpia gènica. Una altre especialista ens va explicar que potser en un futur la teràpia gènica acabava sent la primera línia de tractament.

Efectivament. El trasplantament de medul·la és més o menys aconsellable,

depenent de que tu trobis un donant que sigui més o menys compatible. Tu no pots trasplantar qualsevol medul·la a qualsevol persona, ha d'haver una certa compatibilitat. La compatibilitat ideal és la d'un germà que hagi rebut exactament els mateixos haplotips que tu, aquest seria el donant ideal i no hi hauria moltes complicacions perquè serieu molt compatibles. Quan no és així, llavors has de buscar un donant que es diu no emparentat: en el món hi ha una base de dades, un registre de donants, i busques el que sigui més compatible. A vegades el trobes i altres vegades trobes un que s'assembla molt però no és exactament igual. Si trobes un bon donant, que s'assembla molt, el risc del trasplantament de medul·la és molt baix, és un procediment bastant segur. Però si és un donant més diferent, el risc de complicacions és molt alt, llavors és una cosa molt poc assumible. En un trasplantament no emparentat tu tens el 50, 60 o 70% de probabilitats que funcioni, però si no funciona et mors per les diferents complicacions que hi ha associades. Llavors cal pensar, és assumible aquest risc o és massa arriscat? En aquest cas és quan la teràpia gènica passa a ser la primera elecció. Si tens un bon donant germà, normalment el trasplantament es l'ideal, si no tens un bon donant llavors és cada vegada més aconsellable fer teràpia gènica ja que se sap que funciona.

-També hem vist que hi ha un altre tipus de tractament, que es basa en injectar l'enzim ADA amb un combinat de solució PEG. Dels tres tractaments, quin seria el més eficaç?

El tractament amb PEG també és eficaç, el problema que té és que és molt car, cada any per pacient, ens en podem anar a desenes de milers d'euros. Pel sistema sanitari és massa car, i si arriba al mercat un altre tipus de tractament millor, apostarà pel nou. L'altre inconvenient és que l'has de prendre de per vida, no el pots deixar mai. En canvi la teràpia gènica amb una sola vegada ja et cura, i encara que aquesta única vegada sigui cara la persona no haurà de rebre més el tractament amb ADA que dura tota la vida. Però una cosa i l'altre no són incompatibles, és a dir, aquests nens fins que no es tracten amb teràpia gènica estan rebent tractament amb ADA, per això no necessiten està en bombolles de plàstic. En el passat perquè si que ho necessitaven? Perquè no hi havia aquest tractament amb PEG i eren susceptibles d'agafar infeccions, ara com que s'injecten l'ADA no és necessària aquesta protecció perquè el seu sistema

immune va fent. Aquest tractament es dona des del diagnòstic fins al trasplantament o la teràpia gènica.

-Per al tractament del SCID, quin tipus de virus s'utilitza?

S'utilitzen retrovirus, gammaretrovirus o bé lentivirus.

-I els Selvin Activator Virus?

Sí, són aquests els que es fan servir. Els que provocaven leucèmies no eren aquest tipus de virus, si no que eren retrovirus normals, la primera generació de retrovirus tenia un promotor molt potent que podia activar el gen del costat. En canvi, els Selvin Activator Virus no poden activar el gen del costat, però els hi has de posar un promotor diferent.

-Es preveuen efectes secundaris a llarg termini en aquests pacients?

Aquesta és la pregunta del milió. No ho sap ningú perquè, qui sap el que passarà d'aquí deu anys? Ara de moment en medicina, quan creus que una cosa ha de funcionar ho proves i fins que no ha passat molt temps no saps realment si pot passar alguna cosa més endavant o no. Ara et posaré un exemple: se sap que la quimioteràpia per curar el càncer provoca càncer també, és un verí que provoca mutacions que poden arribar a provocar càncers secundaris que apareixen al cap de 20 anys. Però deixaràs de donar la quimioteràpia perquè potser d'aquí 20 anys et provocarà un altre càncer? No ho faràs, i amb teràpia gènica passa el mateix: tu has de tractar el pacient i si apareixen complicacions ja es veurà, però ara és impossible preveure si hi haurà complicacions al cap de 20 anys. Potser sí que n'hi haurà, de fet l'ADA és una malaltia que no només afecta els limfòcits si no que afecta a més llocs, el dèficit d'aquest enzim el tenen totes les cèl·lules del teu cos i tu no estàs corregint el defecte en altres llocs que no siguin el sistema hematopoètic, no corregeixes ni el sistema nerviós, ni les cèl·lules del cor ni les del fetge. De moment no se sap què pot passar quan tinguis 40 anys perquè fins ara no hi ha hagut cap pacient amb dèficit d'ADA que hagi viscut 40 anys, és ara que es comencen a tractar amb teràpies que son eficaces com la solució PEG, els trasplantaments o la teràpia gènica. I ara els pacients amb més edat que hi ha deuen tenir uns 20 anys, és a dir, que encara no es pot saber i s'ha d'anar veient com evolucionen aquests pacients.

-Després de modificar genèticament unes cèl·lules de llevat hem pogut comprovar la dificultat del procés. Les cèl·lules de llevat s'han de preparar perquè puguin acceptar el nou ADN. En el cas de la teràpia gènica, els pacients del SCID també cal preparar-los d'alguna manera?

No, en aquesta malaltia no és necessari, només se'ls hi ha d'extreure les cèl·lules. Si es fes un trasplantament normal del moll de l'os sí que s'hauria de fer un tractament preparatiu perquè cal matar les cèl·lules que tu ja tens per fer lloc a les que tu modifiques. Però en el cas de l'ADA o la gamma no cal, perquè ja tenen espai suficient i accepten fàcilment qualsevol cèl·lula que hi posis sense necessitat de fer-hi cap tractament. Per tant s'extreuen directament les cèl·lules i es modifiquen, procediment que es diu *ex vivo*, fora de la persona i una vegada modificades es tornen a injectar per via intravenosa. Aquestes cèl·lules tornen a anar al moll de l'os i allà ja fan la seva funció.

-Quin factor determina que una malaltia es pugui tractar amb Teràpia Gènica i l'altre no? Pel que hem vist, les malalties monogèniques són les úniques que es poden tractar.

L'àmbit d'aplicació de la teràpia gènica no és gaire ample, de moment només són tractables les malalties genètiques hereditàries que són monogèniques, és a dir, que hi ha un sol gen afectat, i el càncer sobretot és el segon àmbit d'aplicació. Però en tots els altres tipus de malalties no seria aplicable, com en la hipertensió o la diabetis, seria molt difícil. En les monogèniques sí, però són molt poques malalties les que pots corregir. Per exemple, imagina't que hi ha una malaltia on hi ha un gen que durant el desenvolupament embrionari provoca que tinguis un sistema nerviós alterat, aquí ja has arribat tard amb la teràpia gènica perquè ja no pots corregir el desenvolupament, ja s'ha produït. En el moment de néixer ja s'ha fet l'embriogènesi, ja s'han format els òrgans i ja no hi pots fer res. El que vull dir, és que de limitacions n'hi ha moltes, i hi ha malalties on la teràpia gènica no hi pot fer res.

-I en el cas d'una malaltia que sigui provocada per més d'un gen defectuós?

Aquí també es molt difícil perquè, quin gen tractes? En aquestes malalties poligèniques, com l'obesitat o la diabetis és més complicat, i a més en cada pacient no seran els mateixos gens els que es veuran afectats. En aquests

moments no es contempla que es pugui fer res amb teràpia gènica per les malalties poligèniques, potser d'aquí 20 anys sí, però de moment no.

-Després d'investigar una mica sobre la malaltia hem vist que hi ha cinc tipus diferents del SCID. Totes les variants es podrien tractar amb teràpia gènica o només el dèficit d'ADA i el dèficit de la cadena gamma?

Els altres tipus s'estan investigant en diferents estudis, però els que han arribat als pacients a la clínica són els dos que has mencionat. Però n'hi ha d'altres que potser no són immunodeficiències tan severes, que estan en diferents fases, o bé en preclínic o bé en recerca bàsica, és a dir, només a nivell cel·lular per veure si es corregeix el defecte, que es el que s'ha de fer sempre prèviament. Abans d'anar a clínica s'ha de veure si el gen realment corregeix el defecte cel·lular i que en models animals no hi hagi complicacions, i un cop ho tens tot, et deixen fer l'assaig en humans, i en tot aquest procés passa molt temps.

-La malaltia del SCID ve provocada per un defecte genètic hereditari, però és possible que pugui ser causat per una mutació?

En la immensa majoria de casos és una malaltia recessiva, això vol dir que el nen que pateix la malaltia ha heretat una còpia defectuosa del gen del pare i una altre de la mare, que ells dos estan sans perquè ells tenen l'altre còpia sana del gen, però les dues còpies defectuoses de cada un d'ells ha anat a parar al seu fill. Això passa només un 90% de les vegades. També potser que el fill hereti per exemple, una còpia defectuosa d'un dels dos progenitors i una còpia normal de l'altre (heterozigot), però que hi hagi una mutació *de novo*, vol dir que apareix en un moment del desenvolupament embrionari, i llavors aquest nen ja està malalt. Després és quan estudies els pares i veus que un dels dos és portador i l'altre no, per tan és degut a una mutació *de novo* (rebuda de nou). Però que t'aparegui la mutació a l'edat adulta no, perquè tu ja tindràs bilions de cèl·lules, encara que t'afectés una només seria una cèl·lula, i això segurament passa contínuament. Aquest defecte genètic ja no et faria res a tu, perquè la cèl·lules es moriria i igualment tu seguiries tenint milions de cèl·lules que et funcionarien bé.

-Creu que la teràpia gènica s'hauria de limitar a uns casos molt concrets perquè en un futur no se'n faci un ús indegut?

Com a ús indegut suposo que ens referim al fet de voler ser més intel·ligents o tenir unes qualitats específiques. Si realment s'arriba al punt en què això és factible, que puguem fer més intel·ligents i més guapes a les persones, voldrà dir que la teràpia gènica haurà sigut un èxit i per tant s'hauran pogut curar moltes malalties. Això ja serà com la cirurgia estètica per dir-ho d'alguna manera, ja que tu tens la cirurgia «normal» i la cirurgia estètica per si vols ser més guapo. Si arriba a aquest punt ja no ho podem parar, serà inevitable, hi haurà gent que ho farà i no hi haurà cap llei internacional que ho pugui prohibir. Cada país té la seva legislació, en les investigacions amb cèl·lules embrionàries hi ha països que estan d'acord, d'altres que no; per tant amb la teràpia gènica serà impossible de firmar un acord internacional consensuat per tot el món. Si no ens posem d'acord amb el canvi climàtic i sabem que estem canviant el clima, com creus que ens hauríem de posar d'acord amb un tractament tan revolucionari? Aquesta és la meva opinió es clar. Tot i així, si arriba, serà una cosa imparabile, igual que la clonació humana: el dia que es pugui clonar un humà que això arribarà en un futur no molt llunyà perquè ja s'han clonat totes les espècies. El problema són les desigualtats que hi ha en el món, hi ha països molt pobres, i dintre de cada país hi ha gent molt pobre. Aquesta gent no podrà accedir mai a teràpies d'aquestes, la teràpia gènica serà una cosa exclusivament pels rics i els països rics, no serà un medicament com l'aspirina que tothom la pot comprar al mercat. De fet, el primer tractament de teràpia gènica que s'ha provat a Europa es diu Glybera que serveix per tractar un dèficit genètic, i val un milió quatre cents mil euros per persona. Qui pot pagar això? No s'ho pot pagar ningú.

-Els pacients tractats fins a dia d'avui, han hagut de pagar aquests preus tan elevats o els hi ha subvencionat l'estat?

Jo diria que aquí a Espanya ningú ha hagut de pagar aquesta quantitat de diners. És impossible de pagar, el problema d'aquestes teràpies és que són molt cares. De fet, ara per l'ADA ha sortit un tractament comercialitzat, una indústria farmacèutica que es diu Glaxo Smith Kline (GSK) a partir de l'any que bé comercialitza un tractament per l'ADA. El mateix tractament que es feia als hospitals i als grups que treballen amb això, ara ho farà Glaxo. I com funcionarà

aquest tractament? Doncs ara imagina't que aquí a la Vall d'Hebron diagnostiquen un nen amb dèficit d'ADA: aquest nen el tindran aquí ingressat, li trauran cèl·lules del moll de l'os, les enviaran algun lloc d'Europa on Glaxo duu a terme aquests tractaments, allà es farà la modificació amb els retrovirus i les cèl·lules tornaran a viatjar fins aquí i li injectaran al nen. I això potser valdrà un milió d'euros, encara no és segur perquè no sortirà fins l'any que bé. Però aquest és el model de comercialització que té aquest tipus de teràpia gènica *ex vivo* i està a punt de sortir.

En el cas de l'ADA com que hi ha molt pocs pacients, potser a Espanya hi ha un cas a l'any o dos, doncs potser si que es subvenciona. Però si fos com l'hepatitis c que hi ha moltes persones afectades no seria accessible per tothom perquè no hi ha prou diners. Quan són malalties molt rares i hi ha un tractament que funciona molt bé, potser acaba sortint més a compte pagar un milió d'euros en un únic tractament, que no pas haver de pagar per tota la vida la solució recombinant d'ADA. Hi ha molts medicaments crònics d'aquests que valen 200, 300 o 400 mil euros a l'any, i si pots curar aquestes malalties de per vida al preu d'un milió d'euros, al cap de quatre anys ja els has amortitzat.

-Però les indústries farmacèutiques no preferirien apostar per un tractament crònic que no pas per un tractament un cop a la vida?

Les indústries farmacèutiques han estat vetant la teràpia gènica durant molts anys, però quan han vist que la teràpia gènica ha funcionat molt bé, ja no ho poden parar ja que això serà un èxit sí o sí. Llavors no els hi queda més remei que apostar-hi, ja que no hi poden competir. Però de moment hi ha moltes companyies que s'estan resistint perquè els hi surt molt més a compte vendre medicaments durant tota la vida. El mateix passa amb la vacuna de la SIDA, a les indústries farmacèutiques els hi va millor donar retrovirals tota la vida, i si poden frenar la vacuna ho faran, però el dia que algú la inventi no ho podran aturar més.

5.4. Conclusions

A partir d'aquestes entrevistes als especialistes, hem pogut extreure molta informació important que ens ha ajudat a desenvolupar unes conclusions finals més encertades i completes que mencionarem més endavant.

En primer lloc, ens han confirmat varies hipòtesis que teníem abans de fer les entrevistes, així com, ens han resolt dubtes i ens han donat punts de vista més diferents dels que ens pensàvem. D'aquesta manera hem pogut conèixer una mica millor aquest món de la biomedicina i veure'l des de diferents punts de vista. Cal dir també, que no totes les preguntes han estat respostes de forma aclaridora, alguns d'ells han començat explicacions que han divagat una mica sobre la pregunta en qüestió. Tot i així, gràcies a aquest fet, ens han aportat uns coneixements que no esperàvem obtenir i ens han donat una lleugera visió sobre aquest futur no gaire llunyà que ens està per arribar.

Ha estat un honor i una experiència molt gratificant poder parlar amb aquests científics reconeguts internacionalment en el camp de la biomedicina, no només pels seus treballs sinó també pels articles publicats i els premis dels quals han estat guardonats.

6. CONCLUSIONS

Després de realitzar tot el treball i parlar amb els especialistes, hem pogut comprovar la nostra hipòtesi inicial: com que la deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa que provoca el SCID és una malaltia monogènica es pot tractar amb teràpia gènica. Però també hem pogut veure que no és només per aquest motiu, sinó que hi ha més d'un factor que fa que la teràpia gènica sigui un tractament viable per a aquesta malaltia.

A continuació us presentem les diferents conclusions a les quals hem arribat, que recullen totes les idees principals del treball:

- En primer lloc, cal tenir clar que la primera línia de tractament per als nens que pateixen aquesta malaltia no és la teràpia gènica, sinó que és el trasplantament de medul·la òssia. Tot i així, aquesta opció només és possible si es té un donant histocompatible. Els millors casos es donen quan hi ha un germà que tingui un genotip semblant. Però hi ha casos en que això no és possible, i llavors cal buscar un donant no emparentat. La compatibilitat amb aquest tipus de donant però, ha de ser alta, ja que hi ha un 25% de mor associada si el trasplantament no surt bé.

També hi ha un altre tipus de tractament, que és la solució PEG combinada amb l'enzim ADA, que és la que se'ls hi proporciona aquests nens fins que no se'ls hi fa un trasplantament o teràpia gènica. Aquesta solució és la que els hi permet viure fora d'una bombolla de plàstic. Antigament com que no es coneixia aquest tractament, els pacients havien d'estar aïllats en bombolles de plàstic. La solució PEG però, és extremadament cara i és un medicament crònic.

- Abans de que la teràpia gènica fos un èxit per al SCID, van haver tot un seguit de limitacions que van aturar els assaigs. Inicialment, en un dels assaigs clínics del SCID van aparèixer leucèmies, en la variant de la deficiència de la cadena gamma. Això va ser degut a que es van utilitzar un tipus de virus que eren integratius, és dir, que el material genètic s'integrava dins el genoma de la cèl·lula hoste; i aquests virus que es pensava que s'integraven aleatòriament, es col·locaven a prop d'oncògens. Els oncògens són gens que normalment es troben silenciats, però que si

s'activen indueixen la formació d'un tumor. Si el gen introduït pel virus tenia un promotor molt potent, podia arribar a activar aquests oncògens. Tot i així, això només va passar en un tipus de SCID, i no en el que hem estat tractant en aquest treball. Per evitar futures leucèmies, es van millorar els virus utilitzats que eren retrovirus, gammaretrovirus o lentivirus, i es van crear els *Selvin Activator Virus*. Des d'aquesta nova generació de virus que no es van produir nous casos de leucèmia.

- Una de les coses que ens preguntàvem a l'inici de fer el treball era l'eficiència del procediment *ex vivo* i *in vivo*. Ara doncs, podem dir que el tractament *ex vivo* pot tenir la mateixa eficiència, però és molt més segur. Al tractar les cèl·lules en un laboratori, pots eliminar els virus sobrants, i només introduir aquelles cèl·lules que tu vols. En canvi, *in vivo*, no es pot controlar on actua el virus ni si només infectarà les cèl·lules diana, sempre hi ha més risc. A més, amb el procediment *in vivo* es pot produir un efecte vacuna, que el teu cos reconegui aquell virus i ja tingui anticossos preparats per defensar l'organisme.
- Si sumem a aquests problemes el fet que la teràpia gènica és una tecnologia revolucionària i molt perillosa si se'n fa un ús indegut, trobem que hi ha moltes limitacions legislatives. Tal i com ens va explicar Miguel Chillon, els comitès d'ètica només aproven aquell projectes que compleixen els múltiples requisits necessaris, i al cap de molt temps. La possibilitat que la teràpia gènica pugui derivar en la modificació personalitzada del genoma en benefici de l'home, genera un cert temor entre la comunitat científica. Els comitès d'ètica estan posant molt de pes per evitar que passi com amb la radioactivitat, que al poc de ser descoberta es va crear la bomba atòmica. En un futur aquesta tecnologia serà molt més barata que ara, i serà molt senzill accedir als mitjans necessaris per manipular els gens humans. Després de fer les entrevistes, hem vist que el problema no està en que tu canviïs el color dels ulls o del cabell, el problema apareix quan es comença a jugar amb el nombre o l'ordre dels gens, o quan es vulguin potenciar certes qualitats, com la musculatura o la intel·ligència.

Actualment, el Comitè Olímpic Internacional està darrere d'una pràctica molt relacionada amb aquest tema. Es creu que hi ha persones que són capaces de modificar genèticament la massa muscular dels esportistes d'elit, per tal d'augmentar-la. Aquest experiment és indetectable, ja que amb el temps, aquelles cèl·lules que tu has modificat són substituïdes per altres (s'utilitzen virus no integratius), i per tant no queda rastre de cap manipulació genètica. I aquesta tecnologia no seria gaire cara, costaria al voltant d'uns 500€, és a dir, que seria accessible per la majoria d'esportistes d'elit. Encara que el dopatge genètic no s'hagi detectat, és una realitat present.

- Tornant a la part clínica, un dels motius pels quals l'ADA-SCID va ser un èxit i altres malalties monogèniques no, és gràcies a l'avantatge selectiu que se'ls hi proporciona a les cèl·lules. Tal i com ens ha explicat Jordi Barquinero, aquest avantatge implica que les cèl·lules de la medul·la proliferin més i acabin apartant i fent minoritàries les cèl·lules defectuoses. La deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa provoca que s'acumulin metabòlits tòxics per a la cèl·lula en el seu interior. La correcta funcionalitat d'aquest enzim provoca que no s'acumulin aquests metabòlits, i que per tant les cèl·lules sobrevisquin.

El fet de ser monogènica és clau es clar, tots els especialistes estan d'acord en que en les malalties poligèniques, la teràpia gènica de moment és inviable. Però no tots coincideixen en els motius. El Dr. Chillon afirma que tot és una qüestió econòmica, no es tracta de limitacions tecnològiques, cosa que creuen el Dr. Barquinero i la Dra. Fillat. El fet de ser poligèniques, vol dir que afecten més d'un gen, i per tant s'han de plantejar altres abordatges. En el cas del càncer per exemple, s'intenta induir la mort de la cèl·lula. Però en malalties com la obesitat o la diabetis, en que cada persona pot tenir diferents gens alterats, ja és més complicat, i de moment no s'han trobat solucions. Per tant, realment són molt poques les malalties que puguin ser tractades amb teràpia gènica.

- També hem vist que si la teràpia gènica no avança tan ràpid com ens pensàvem, és pel fet que la majoria d'assaigs clínics són molt llargs. Abans

que un medicament es comercialitzi, hi ha tot un seguit de fases preclíniques que cal realitzar. Primer es prova el producte a nivell cel·lular als laboratoris, després en animals, i si fins aquí tot ha anat bé després ja es passa a provar en humans, primer a grups reduïts i després a grups més grans, i finalment la comercialització. Cada fase implica uns dos, tres o quatre anys, independentment dels permisos legislatius, que poden arribar a trigar un any en donar-te'ls. Això provoca que abans de comercialitzar el producte et puguis estar perfectament 10 o 15 anys. Això és degut a que es necessita un cert temps per veure la funcionalitat del virus abans de ser comercialitzat.

Cal apreciar que aquests tractaments són caríssims. Com que la majoria de vegades són malalties inusuals, l'Estat subvenciona el tractament, que pot costar milions d'euros. Però realment, si es compara amb el fet d'estar pagant un tractament crònic que en valgui milers, a la llarga acabes amortitzant el milió d'euros. De fet, *Glybera* és el primer tractament de teràpia gènica comercialitzat a Europa, que costa un milió quatre cents mil euros, però el tractament crònic costa quatre cents mil euros l'any, per tant en quatre o cinc anys ja has amortitzat el tractament.

- El problema també està en saber si la teràpia gènica a la llarga acabarà derivant en efectes secundaris no desitjats. Això de moment no es pot saber, ja que els primers pacients de SCID tractats amb teràpia gènica ara deuen tenir uns 20 anys.
- En relació a la part pràctica realitzada al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, la tècnica que vam utilitzar va ser la recombinació homòloga, però aquesta només és possible amb cèl·lules senzilles com les de llevat i en un laboratori. En el cas dels humans, encara no s'ha donat cap cas que aquesta recombinació hagi estat possible, ja que no es té la tecnologia necessària.
- Hem volgut comentar aquí també els resultats de les enquestes que hem inclòs a l'apart d'ètica dels annexes. Després de realitzar les enquestes, hem pogut comprovar que el coneixement de la població sobre la teràpia

gènica és mínim, com a molt n'han sentit a parlar o saben de què tracta. Altres tecnologies, com les cèl·lules mare, sí que són més conegudes gràcies sobretot als mitjans de comunicació. Tot i així, en parlarem àmpliament més endavant, en els annexes.

Finalment, hem pogut conèixer en què consisteix realment la deficiència de l'enzim adenosina-desaminasa, veure'n els diferents tractaments, i especialitzar-nos en la teràpia gènica. A més hem pogut veure com es tractaria aquesta malaltia des d'un punt de vista preclínic, ja que ens hem endinsat en el món de la biomedicina, dels laboratoris, de les tècniques utilitzades i de les diferents complicacions que hi pot haver. Podem dir doncs, que hem complert l'objectiu que ens havíem proposat i hem corroborat i ampliat la nostra hipòtesi inicial. Tot i així, ens queda el dubte del que passarà en un futur, és a dir, de l'ús que es farà de la teràpia gènica i de la part econòmica que comportarà.

7. BIBLIOGRAFIA

- BENITEZ, Javier. ¿Por qué nos parecemos a nuestros padres? Madrid: Temas de hoy, 1997.
- BUENO, David; TRICAS, Maria. Gens i Genoma. Barcelona: Pòrtic, 2001.
- HENDERSON, Mark. 50 cosas que hay que saber sobre genética. Barcelona: Planeta, 2008.
- KNUDTSON, Peter; SUZUKI, David. GenÉtica. Madrid: Tecnos, 1991.
- PIERCE, Benjamin. Genética, un enfoque conceptual. Estats Units: Editorial Médica Panamericana, 2005
- PREVOSTI, Antoni. L'enginyeria genètica. Barcelona: Barcanova, 1992.

Webgrafia

- Medicina Buenos aires. Aspectos éticos de la terapia gènica, <<http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol58-98/2/aspectoseticos.htm>> (Consulta: 08/11/2015).
- Gene Therapy Net. What is gene therapy, <<http://www.genetherapynet.com/non-viral-vectors/176-non-viral-vectors.html>> (Consulta: 08/09/2015).
- Acta bioethica. Terapia Génica y principios éticos, <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S1726-569X2003000100007&script=sci_arttext&tlng=pt> (Consulta: 02/11/2015).
- Revista médica de Chile. La terapia génica y sus aplicaciones, <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98871998000700013> (Consulta: 08/11/2015).
- Kids Health. Inmunodeficiencia combinada grave, <http://kidshealth.org/parent/en_espanol/medicos/severe-immunodeficiency-esp.html#> (Consulta: 03/07/2015).
- Sociedad chilena de alergia e inmunología. Inmunodeficiencia combinada severa, <<http://www.scai.cl/node/39>> (Consulta: 03/06/2015).
- Profesor en línea. Sistema hematopoyético, <<http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/SistemaHematopoyetico.htm>> (Consulta: 08/11/2015).

- Wikipedia. Inmunodeficiencia combinada grave, <https://es.wikipedia.org/wiki/Inmunodeficiencia_combinada_grave#Tipos> (Consulta: 08/11/2015).
- Biblioteca virtual. Terapia Génica, <<http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf>> (Consulta: 03/07/2015).
- Farmavet. Avances de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades monogénicas, <https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/farmavet/amgen.es/web/archivos/biotecnologia9/6_Avances%20de%20la%20terapia%20genica.pdf> (Consulta: 03/07/2015).
- Orphanet. Inmunodeficiencia combinada severa, <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=276> (Consulta: 05/07/2015).
- Wikipedia. Linfocito T, <https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito_T#Activaci.C3.B3n_de_linfocitos_T> (Consulta: 05/06/2015).
- Primary Immune. Inmunodeficiencia combinada severa, <<https://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2011/04/Inmunodeficiencia-Combinada-Severa.pdf>> (Consulta: 22/10/2015)
- Severe Combined Immunodeficiency. About SCID, <<http://www.scid.net/the-scid-homepage/about-scid/>> (Consulta: 15/09/2015).
- Elsevier. Terapia génica de las enfermedades hepáticas, <<http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-terapia-genica-las-enfermedades-hepaticas-12597>> (Consulta: 24/08/2015).
- Inmunodiagnostico. Inmunología, <<http://www.inmunodiagnostico.cl/ofertas/2011/06/22/adenosinadeaminasa-ada/>> (Consulta: 17/08/2015).

Fonts imatges

Fig. 1: http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Herencia_y_genetica.html

Fig. 2: https://es.wikipedia.org/wiki/Autos%26%3Bmico_recesivo

Fig. 3: <http://www.monografias.com/trabajos97/hematopoyesis/image004.jpg>

Fig. 4: https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito_T

Fig. 5: https://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_deaminase

Fig. 6: https://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_deaminase

Fig. 7: <http://learn.genetics.utah.edu/content/disorders/singlegene/ada/>

Fig. 8: <http://learn.genetics.utah.edu/content/disorders/singlegene/ada/>

Fig. 9: <https://www.worldmag.com/mobile/article.php?id=32405>

Fig. 10: <http://decine21.com/img/upload/obras/El-chico-de-la-burbuja-de-plastico-15891/El-chico-de-la-burbuja-de-plastico-15891-C.jpg>

Fig. 11: <http://www.anatolandia.com/2014/08/trasplante-de-celulas-madre-de-la-medula-osea-y-de-sangre-del-cordon-umbilical.html?m=0>

Fig. 12: <http://www.donantescordoba.org/content/cordoba-se-vuelca-con-el-reto-de-lograr-427-donantes-de-medula-osea>

Fig. 13: <http://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2013/09/First-Gen-Therapy-Patients-1993.jpg>

Fig. 14: <http://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2013/09/First-Gen-Therapy-Patients-2013.jpg>

Fig. 15: http://figshare.com/articles/Retroviral_virion_structure/807677

Fig. 16: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Adenovirus-based_Gene_Therapy:_a_Promising_Novel_Cancer_Therapy

Fig. 17: <http://e-ciencia.com/blog/divulgacion/vacunas-de-dna-%26%BFvacunas-de-tercera-generacion/>

Fig. 18: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_-22/S1462399403006562sup005.gif

Fig. 20: <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/images/-figure111.jpg>

ANNEXES

L'ÈTICA I LA TERÀPIA GÈNICA

A continuació us presentem l'apartat d'ètica d'aquest treball. En aquesta part parlarem del perquè aquesta tecnologia genera tanta controvèrsia i planteja tants problemes ètics.

Algú ha dit, alguna vegada, que la teràpia gènica serà la quarta revolució en medicina, de forma consecutiva a la introducció dels primers sistemes sanitaris pel control de les infeccions, la implantació de l'anestèsia i la introducció de les vacunes i els antibiòtics.

Com a conjunt de procediments innovadors, la teràpia gènica planteja en la seva aplicació conflictes potencials de diferent ordre: mèdic, ètic, econòmic i social.

La teràpia gènica inclou un conjunt d'estratègies on la particularitat recau en l'ús de material genètic, avui en dia més ben conegut que dècades enrere, amb finalitat terapèutica. Podem suposar que algun dia totes o casi totes les malalties genètiques podran ser combatudes amb aquest mètode, i fins i tot poder preveure-les.

Podríem considerar que el fet ètic prioritari (tot i que no és l'únic) consisteix en que per primera vegada, en el laboratori, l'home ha estat capaç de sortejar les barreres de la naturalesa. Per primera vegada l'home té a les mans el poder de canviar genèticament una espècie sencera i crear-ne una totalment diferent. Ens enfrontem a una revolució en la qual l'home té la possibilitat de transformar-se a si mateix i controlar la seva pròpia evolució biològica. El conjunt d'actituds, conviccions, creences morals, religioses i formes de conducta que regeixen actualment en la nostra societat, són insuficients per entendre i acceptar les conseqüències que els avanços de la biotecnologia plantegen en el camp de l'enginyeria genètica aplicada a la medicina, el que provoca que sigui imprescindible un profund debat ètic sobre l'ús d'aquestes tecnologies.

El progrés en el camp de la biomedicina, i en particular en el de la teràpia gènica, ha obert interrogants que generen moltes incerteses en diversos sectors de la societat, respecte l'abast i el límit d'aquests avanços científics. A aquesta situació li sumem, que en alguns països no existeixin marcs reguladors per a aquestes activitats, pel que els científics han d'autoregular-se d'acord amb les

seves pròpies creences i conviccions. L'aplicació abusiva de les diverses tecnologies biomèdiques és el que genera preocupacions. Per tant, és fonamental que la societat s'informi sobre tots els aspectes relacionats amb la teràpia gènica i a partir d'això promoure un debat per contestar les noves preguntes que es plantegen.

Actualment existeixen més de 250 protocols clínics en curs aprovats per la RAC-FDA (Recombinant Advisory Committee, Food and Drug Administration) als Estats Units i prop de 50 a Europa. L'acceptació de que gens defectuosos o inactius puguin ser reemplaçats per gens funcionals està modificant els conceptes terapèutics vigents.

La teràpia gènica constitueix la forma de manipulació genètica que tracta de corregir o disminuir els efectes que ocasionen malalties d'origen genètic. Hi ha però, nombroses dificultats tècniques que no estan del tot resoltes. No s'ha demostrat encara l'eficàcia clínica i es poden produir danys irreversibles en l'organisme. Per una part, existeix la necessitat de regular aquesta tècnica, per mitjà de protocols que han de ser rigorosament analitzats per comitès ètics.

Per veure l'opinió pública sobre la teràpia gènica i els riscos que comporta, hem realitzat unes enquestes a la població. Aquestes enquestes consten de dues parts: una primera part ens permetrà veure el grau de coneixement que té la gent sobre diferents branques de l'enginyeria genètica, i una segona part ens permetrà conèixer l'opinió i el sentit de l'ètica que hi ha entre la població respecte a la teràpia gènica.

MODEL D'ENQUESTA

1. Sexe

- Dona Home

2. Educació

- Primària Grau
 Secundària Cicles
 Batxillerat Altres _____

3. Ocupació

4. Edat

- 12-16 36-50
 17-25 +50
 26-35

5. Saps què és la biotecnologia?

- Sí
 No

6. Quins coneixements tens sobre les branques que abasta?

	poc			molt	
	1	2	3	4	5
Clonació	1	2	3	4	5
Teràpia Gènica	1	2	3	4	5
Projecte Genoma Humà	1	2	3	4	5
Transgènics	1	2	3	4	5
Cèl·lules mare	1	2	3	4	5

La teràpia gènica és un tractament mèdic que consisteix en manipular els gens (ADN) de cèl·lules malaltes per corregir un defecte que provoca una malaltia genètica. Amb l'ajuda de virus (generalment) s'introdueix el gen mitjançant unes tècniques específiques.

7. Creus que és ètic modificar els gens dels humans?

- Sí
- No
- En alguns casos. Quins? _____

8. I, està d'acord amb la modificació dels gens d'alguns animals o plantes per millorar-ne les qualitats?

- Sí
- No
- En alguns casos. Quins? _____

9. Creus que és correctament ètic tractar NOMÉS els malalts molts greus i sense més alternatives amb teràpia gènica?

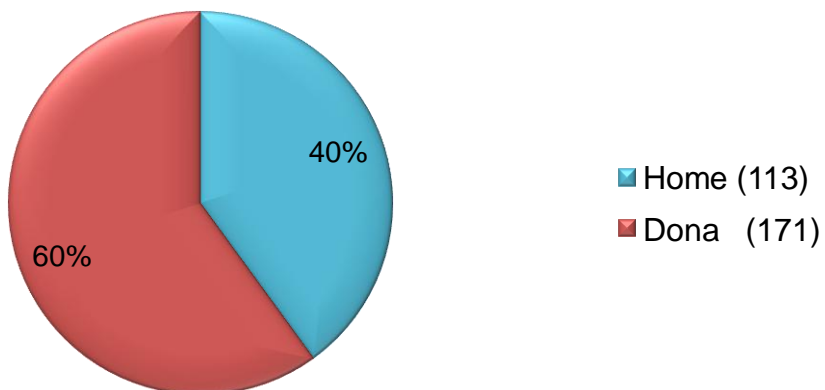
- Sí
- No

10. Quin creus que és el problema més greu que pot comportar la teràpia gènica?

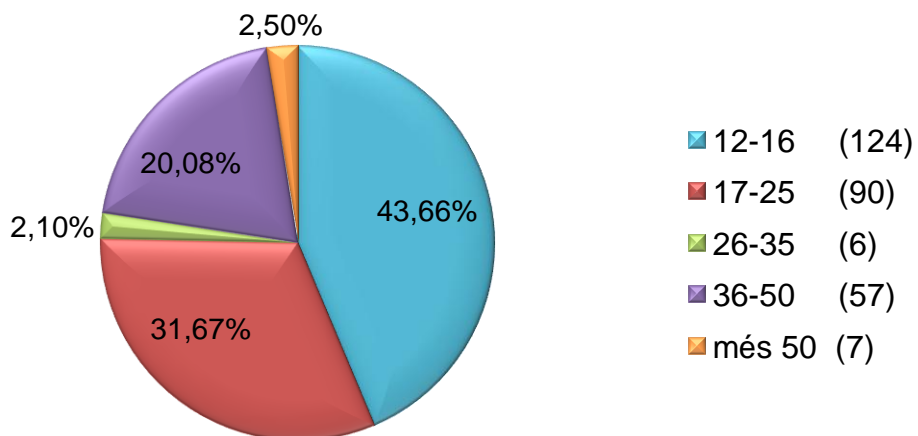
- Pot provocar un tumor
- Pot produir un desequilibri en l'organisme
- En canvi pot afectar a generacions futures
- Només hi podrien accedir aquells que s'ho poguessin permetre

RESULTATS

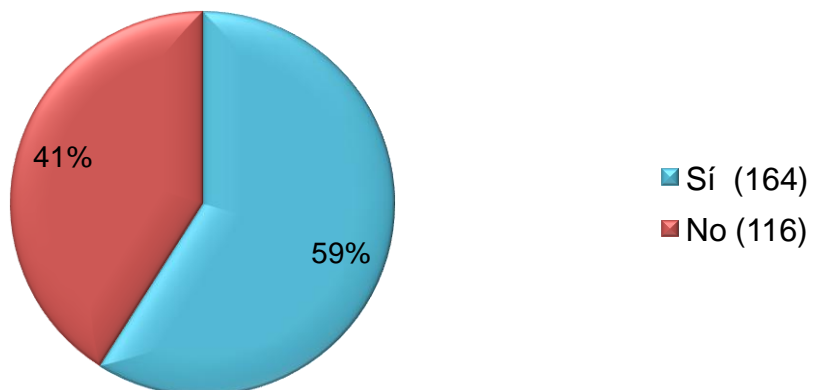
Sexe



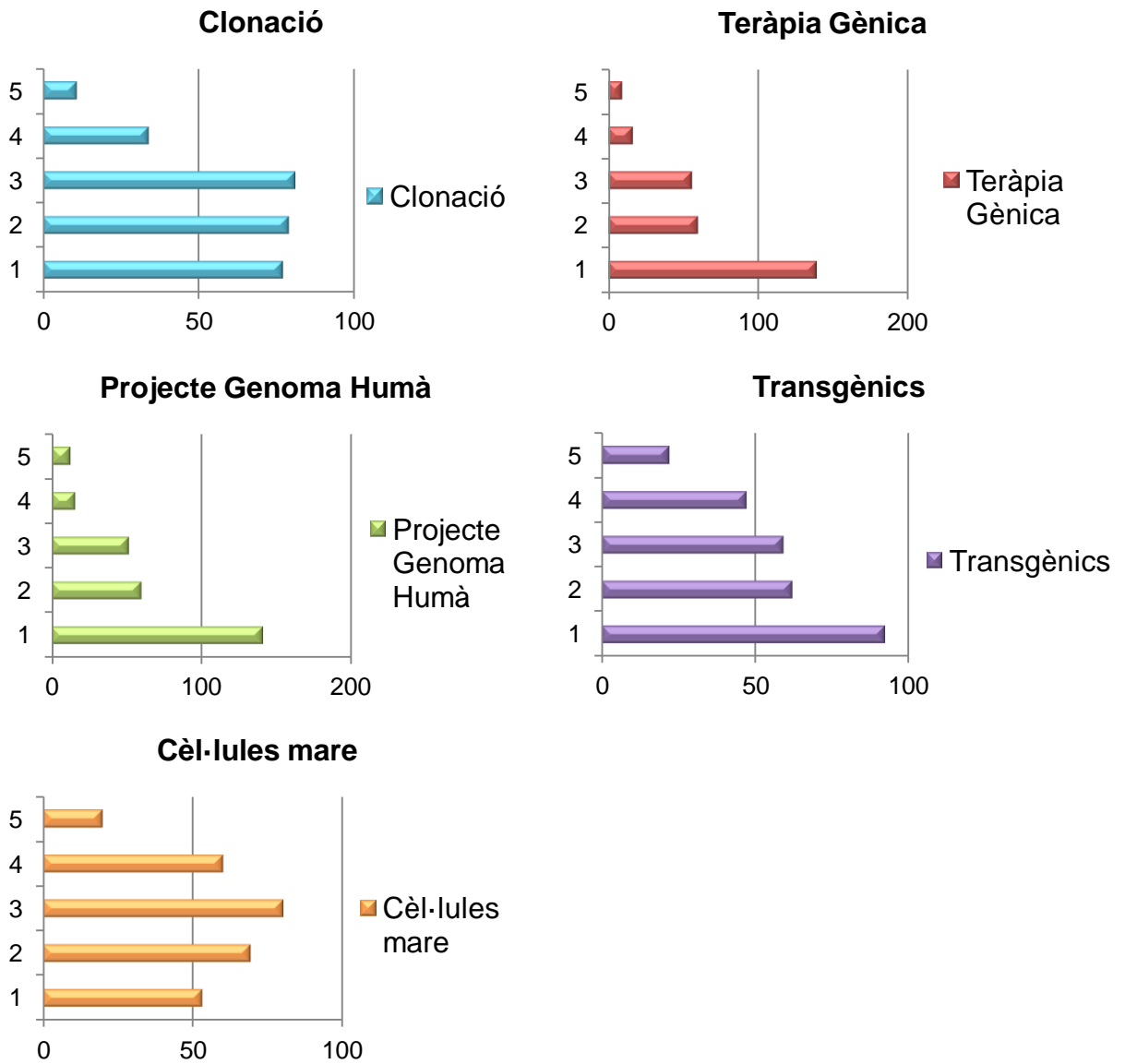
Edat



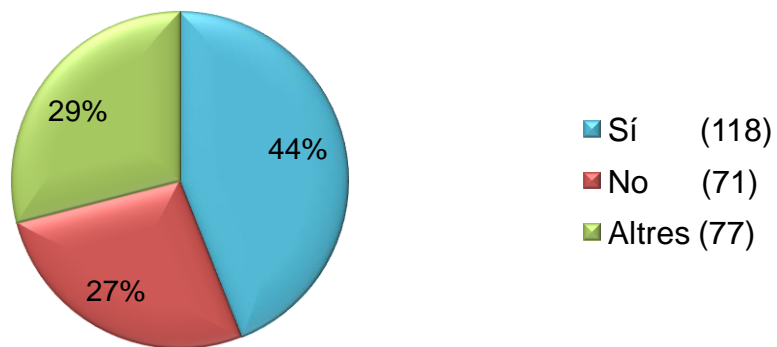
Saps què és la biotecnologia?



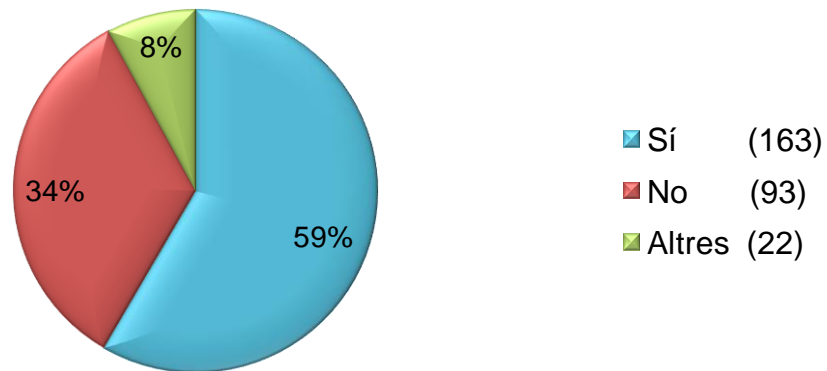
Quins coneixements tens sobre les branques que abasta?



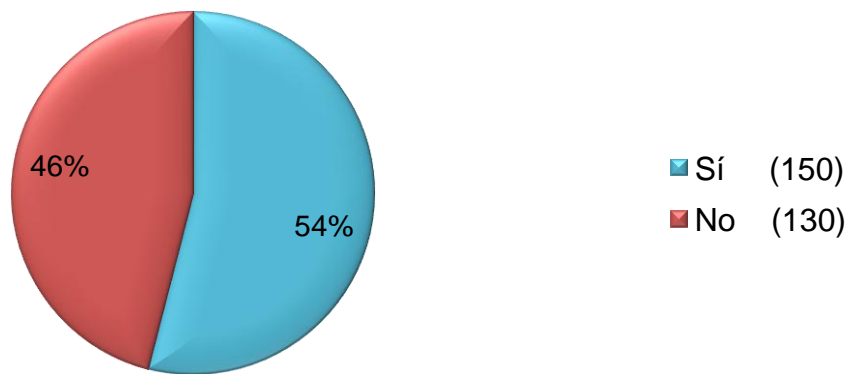
Creus que és ètic modificar els gens dels humans?



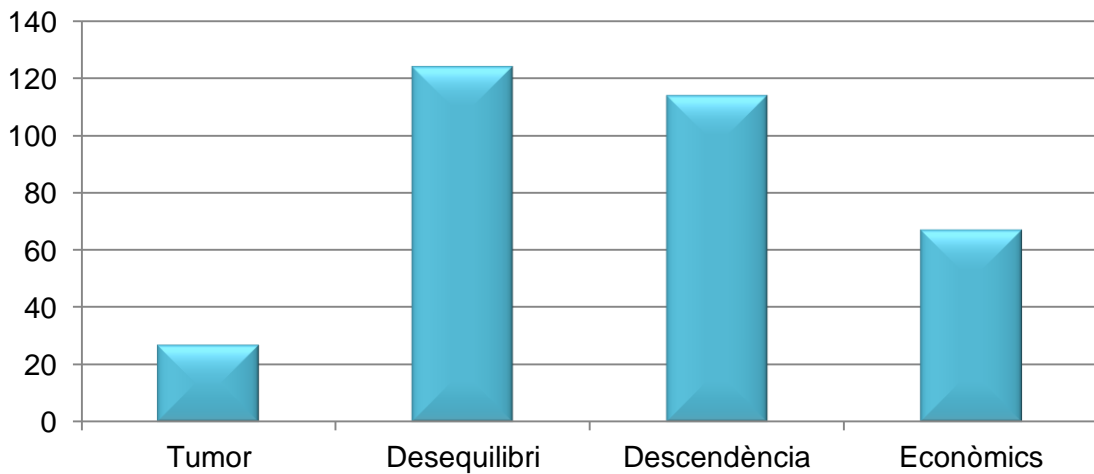
I, estàs d'acord amb la modificació dels gens d'alguns animals o plantes per millorar-ne les qualitats?



Creus que és correctament ètic tractar **NOMÉS els malalts molt greus i sense més alternatives amb teràpia gènica?**



Quin creus que és el problema ètic més greu que pot comportar la teràpia gènica?



CONCLUSIONS

Després de realitzar les enquestes i observar els gràfics obtinguts hem pogut arribar a les següents conclusions.

Més de la meitat de la població sap o ha sentit a parlar de la biotecnologia, concretament un 58%. Tot i així, podem observar que els enquestats de 12 a 16 anys la majoria no sap què és. Creiem que es deu a l'escassa informació sobre el tema, ja que els primers coneixements es donen a partir de 4t d'ESO. En els joves (17-25) hem vist que una mica més de la meitat sí que sap què és o n'ha sentit a parlar, depenen dels estudis que estiguin cursant. Finalment els adults (+36), la majoria, ha donat una resposta afirmativa, que creiem que pot ser deguda al fet que pels mitjans de comunicació se'n sent molt a parlar, i en els darrers anys aquest camp ha patit un gran desenvolupament.

Sobre la pregunta del grau de coneixement sobre les diferents branques de l'enginyeria genètica hem pogut establir un ordre: encapçalant la llista trobem la clonació, seguidament les cèl·lules mare, en tercer lloc els transgènics, i en quart i cinquè lloc amb resultats molt similars, primer el projecte genoma humà i finalment la teràpia gènica. La clonació és un concepte molt ampli i conegut per la majoria de públics, ja que es coneix des de fa molt temps, i per tant és més fàcil que la gent en tingui coneixement (s'estudia a partir dels 12 anys). Les cèl·lules mare ocupen el segon lloc ja que és un tractament molt innovador i que se n'ha sentit molt parlar els darrers anys en els mitjans de comunicació. Els transgènics és un tema molt proper al nostre dia a dia, per això la població en té un coneixement més ampli. A més, en els últims anys hi ha hagut molta controvèrsia al voltant d'aquest tema. Per últim, el projecte genoma humà i la teràpia gènica tanquen la llista, ja que un 50% de la població no n'ha sentit mai a parlar. Això és degut a que són temes molt recents i molt específics de l'àmbit científic. Molt pocs dels enquestats tenen un nivell mitjà o alt de coneixements sobre la teràpia gènica.

Entrant ja en la part ètica hem pogut veure que la població és més permissiva amb els animals i els vegetals que amb els humans. Menys de la meitat de la població (44,5%), està a favor de la manipulació genètica en humans, mentre que un 60% sí que està d'acord amb la modificació de vegetals i animals. Això ens fa pensar que a la població li afecta més el fet que la salut humana es

vegi involucrada, i no dóna tanta importància als altres organismes. Si ens fixem en els enquestats que creuen que només s'haurien de manipular genèticament els organismes en alguns casos, podem veure que només un 8% han tingut en compte aquesta opció en plantes i animals, mentre que en humans un 30% dels enquestat creu que la teràpia gènica només s'hauria d'aplicar a malalties molt greus.

Una mica més de la meitat dels participants en l'enquesta creuen que és correcte tractar només els malalts molt greus. Per una part pensem que aquest resultat és degut a que les persones creuen que si hi hagués complicacions amb aquests pacients aplicant aquest tractament tan nou no hi perdrien res perquè seria de les últimes oportunitats mèdiques que podrien tenir. Els que han estat en contra pensem que és pel fet que creuen que tots els malalts s'haurien de poder tractar, i no només aquells que estan molt greus.

Finalment, hem pogut observar un fet molt curiós respecte l'última pregunta. Els enquestat que tenen entre 12 i 16 anys creuen que el problema més greu que pot comportar la teràpia gènica és que et pugui provocar un tumor o un desequilibri en l'organisme. Mentre que la majoria dels adults que han respòs les enquestes creuen que el major dels problemes seria que no hi podria accedir tothom. Això ens fa pensar en que els joves tenen més en compte la pròpia salut, mentre que els adults es fixen més en la part econòmica, és a dir, si ells podrien accedir a aquest tractament.

En resum, aquestes enquestes ens han ajudat a veure per una part quin coneixement té la població sobre aquestes tecnologies tant revolucionàries, com també el temor de la gent davant de la manipulació genètica, ja que hi ha hagut un terç de la població que només es mostra d'acord en cas de malalties greus.

El que us mostrem a continuació, és un petit resum de la resta de branques que abasta l'enginyeria genètica i que hem mencionat anteriorment en les enquestes. També hem adjuntat un breu resum sobre una ciència anterior a la genètica anomenada eugenèsia.

Clonació

Entenem clonar com a obtenir un organisme completament nou que és una còpia de l'original. La clonació més coneguda i important en el món científic va ser la de l'ovella Dolly, el 23 de febrer de 1997, ja que va ser el primer mamífer clonat. Era una ovella de sis mesos que va ser clonada a partir d'una cèl·lula del teixit de la mamella d'una altre ovella. Això va despertar moltes reaccions i opinions a la gent.



Ovella Dolly

La clonació molecular és un conjunt de mètodes experimentals en biologia molecular que s'utilitzen per unir molècula d'ADN recombinant, i per dirigir la seva replicació dins d'organismes hostes. S'anomena clonació, ja que a partir de l'ADN d'una sola cèl·lula, per mitjà de la duplicació, s'obté una gran població de cèl·lules genèticament idèntiques. Per exemple, quan es vol obtenir una proteïna a gran escala, es selecciona el gen d'interès i es replica varies vegades fins a tenir un conjunt de cèl·lules que l'incorporin i sintetitzin aquesta proteïna. Es distingeixen fases:

- Obtenir el fragment d'ADN que conté el gen que es vol clonar.
- Inserir aquest gen a una altre molècula d'ADN que servirà de vector.
- Introduir el vector de clonació amb el gen que ens interessa en una cèl·lula d'un altre organisme, aquesta cèl·lula sol ser una cèl·lula bacteriana per la seva rapidesa i simplicitat en la duplicació.

- Multiplicar dita cèl·lula per obtindrè moltes còpies del gen.

Els organismes que es reproduïxen asexualment practiquen aquest procés de clonació. Com per exemple, en el cas dels bacteris. El principal problema en clonació animal a partir de les cèl·lules és reprogramar el seu material genètic, és a dir, desdiferenciar-les, fer-les embrionàries. Això és necessari, ja que es necessiten cèl·lules diploides per tant no es pot usar el nucli de l'òvul (haploide). Els científics trasplanten a un òvul anucleat, el nucli de la cèl·lula adulta a clonar. Hi ha dos tipus de clonació:

- Clonació terapèutica: Es dur a terme per crear cèl·lules mare embrionàries que seran utilitzades per tractaments mèdics
- Clonació reproductiva: Es dur a terme amb la intenció de crear un nou organisme. Fins al moment, s'ha utilitzat amb finalitats de recerca.

Cèl·lules mare

En el cos humà tenim uns tipus diferents de cèl·lules que constitueixen el nostre organisme. Aquestes s'organitzen en complexos que realitzen les funcions vitals dels éssers vius. Les cèl·lules mare en són un tipus, però no estan especialitzades, i per tant tenen la increïble capacitat de formar tots els altres tipus de cèl·lules. Les cèl·lules mare, al ser una espècie de sistema de reparació per al cos, poden dividir-se potencialment sense límit per substituir cèl·lules danyades. Per dir-ho d'una altra forma, són proveïdores de tots els altres tipus de cèl·lules, i aquestes poden fer més còpies de si mateixes. Per tant, quan les cèl·lules mare es divideixen, poden seguir sent cèl·lules mare o especialitzar-se en un altre tipus de cèl·lula, com una cèl·lula muscular o un glòbul vermell.

Segons l'origen existeixen dos tipus principals de cèl·lules mare: les cèl·lules mare embrionàries i les cèl·lules mare adultes.

Les cèl·lules mare embrionàries només existeixen en les primeres fases del desenvolupament embrionari i són capaces de produir qualsevol tipus de cèl·lula

del cos. Els científics estan començant a comprendre com fer que aquestes cèl·lules es converteixin en qualsevol dels més de 200 tipus de cèl·lules del cos humà.

Les cèl·lules mare adultes són aquelles que no estan diferenciades, que tenen la capacitat de clonar-se i crear còpies de si mateixes per regenerar òrgans i teixits.

En funció de la capacitat de diferenciar-se en més o menys teixits, es distingeixen tres tipus de cèl·lules mare:

- Totipotents: Poden generar un nou individu completament organitzat i estructurat.
- Pluripotents: Poden generar tots els tipus d'individus d'un organisme però no un nou individu.
- Multipotents: Només poden generar uns determinats tipus de cèl·lules.

A l'actualitat, existeixen pocs tractaments amb trasplantaments de cèl·lules mare que siguin segurs i eficaços. El millor exemple és el trasplantament de medul·la òssia. Tot i així l'estudi d'aquestes cèl·lules pot ajudar a explicar com es produeixen alguns quadres seriosos com en el cas dels defectes congènits i el càncer. Algun dia les cèl·lules mare podran utilitzar-se per generar tractaments per la cura de moltes malalties, incloent la malaltia de Parkinson, la malaltia de l'Alzheimer, els traumatismes en la medul·la espinal, les malalties cardíaques, l'artritis i la diabetis.

Transgènics

Són productes d'origen animal o vegetal obtinguts a partir d'individus en els quals la seva informació genètica ha sigut manipulada per l'home amb el fi de millorar-ne les propietats. S'anomenen organismes genèticament modificats

(OGM). Per exemple, existeixen alguns cereals que són resistents a les plagues i les sequeres, fruits que triguen més en madurar o en podrir-se, etc.

Els transgènics s'obtenen introduint un gen d'una espècie al genoma d'una altre amb la finalitat que el gen introduït s'expressi en un organisme on abans no ho feia. De fet, a vegades també és necessari introduir un promotor que en reguli l'expressió.

Els que defensen els transgènics, ho argumenten amb l'augment de la productivitat (que acabaria amb la fam del tercer món), una agricultura més ecològica, la producció de vacunes o d'aliments més rics en vitamines.

Per l'altre banda, els que estan en contra d'aquesta tècnica argumenten que els transgènics són un risc per la salut humana, el medi ambient i l'agricultura, pel fet que acumulen insecticides, perden els seus nutrients o poden provocar una pèrdua de la biodiversitat.

L'arròs daurat és un clar exemple d'arròs transgènic. Es va crear l'any **2000** per pal·liar el dèficit de vitamina A en les persones que s'alimenten fonamentalment d'arròs. Incorpora tres transgens que provoquen que cada gra sintetitzi aquesta vitamina. Es necessiten només 40 grams per pal·liar el dèficit de vitamina A. Uns altres exemples d'aliments transgènics són:

- El blat de moro transgènic, ja que és resistent a insecticides i insectes.
- Els tomàquets transgènics, maduren d'una manera més lenta, la seva pell és més gruixuda i té resistència a les plagues.
- Algunes patates transgèniques que són immunes contra els escarabats.
- El cafè Trueba, té millor sabor i menys cafeïna.
- Algun tipus de blat que produeix farina de millor qualitat.

El projecte genoma humà és el major projecte d'investigació biomèdica de la història. A partir de **1985**, un gran nombre d'investigadors van concebre la possibilitat d'investigar les instruccions presents en el conjunt de gens dels humans. Aquesta investigació va ser anomenada amb el nom "Projecte Genoma Humà" (PGH).

Un gen és un fragment d'ADN que és responsable d'expressar un caràcter. El conjunt de gens d'un organisme constitueix el seu genoma. A mesura que han avançat les investigacions, s'han anat reduint les estimacions sobre el nombre de gens que constitueixen el genoma humà: dels 1.000.000 inicials es va passar a parlar de 60.000 a 80.000 gens, i l'any **2000** l'estimació era de 30.000 gens. Els gens actuen segons la seqüència de bases nitrogenades per les que estan formats: adenina, timina, citosina i guanina.

Al **1990**, el PGH, ja estava en marxa. Diversos països hi participaven, el seu principal impulsor van ser els Estats Units, amb un pressupost d'uns 200 milions de dòlars. L'objectiu era localitzar, identificar i seqüenciar tots els gens de l'ADN abans del 2003. Això suposava conèixer la seqüència de tres mil milions d'alternances entre A, T, C i G (les bases nitrogenades) que componen els gens dels 23 cromosomes. El pas següent ha sigut comprendre les funcions codificades de cada gen i la proteïna que expressen, i identificar els gens responsables de les malalties genètiques.

El projecte inclou elaborar mapes i seqüències dels genomes d'organismes evolutivament senzills, com a models d'estudi. També inclou l'estudi de les conseqüències ètiques, legals i socials que puguin derivar-se de l'adquisició i utilització d'aquest coneixement.

El 15 de febrer del **2001**, el consorci públic va presentar abans del previst, un primer esborrany del genoma. El ràpid èxit ha estat degut a les enormes inversions fetes per diverses empreses de biotecnologia. L'estudi del genoma humà implicarà importants beneficis mèdics. En aquests moments s'ha desxifrat el 100% de tota la informació del conjunt del nostre genoma. Això significa que en pocs anys hi ha hagut un gran avanç, però tan sols és l'inici del camí, ja que encara queda una llarga distància per recórrer. Encara s'ha d'aprendre com

d'aconseguir aquesta exclusió de característiques no desitjades es proposaven mides per evitar la descendència 'defectuosa', així com prohibir els matrimonis que presentaven riscos genètics, o impedir embarassos a aquelles parelles genèticament incompatibles. Si la concepció ja havia tingut lloc, es proposava l'avortament eugenèsic o la mort del nadó acabat de néixer. Les mesures estaven en l'ordre del dia i venien recolzades per l'opinió majoritària del estament científic. Es tractava de restriccions que, segons es deia, s'havia d'imposar a alguns matrimonis pel bé comú de la humanitat. Les esterilitzacions d'alguns ciutadans devien ser també obligatòries, això, o estar sempre reclosos en centres adequats, amb la finalitat d'evitar que poguessin reproduir-se.

- **Positiva:** Intentava difondre al màxim el nombre de gens i genotips considerats com desitjables, és a dir, volien millorar la qualitat de la població. Així doncs arribaven a facilitar alguns matrimonis i atorgaven premis a les famílies genèticament seleccionades que més es reproduïssin. Fins i tot, es van arribar a organitzar concursos i festivals. Sempre va ser més difícil portar a la pràctica l'eugenèsia positiva que la negativa.

DISSENY DE LA PORTADA

Després de realitzar tot el treball vam voler plasmar la idea principal en la portada de dit projecte. El títol ha estat fruit d'una de les autores del treball i la foto és un dibuix realitzat per l'altra autora. La foto és un dibuix fet a mà, el muntatge del qual s'ha fet per ordinador, però hem volgut adjuntar els esbossos originals del dibuix al final del treball. El dibuix representa un bebè afectat pel síndrome de la immunodeficiència combinada severa tancat dins una bombolla, i el seu germà és a fora tocant la bombolla per intentar estar amb ell. La bombolla l'hem fet inacabada per indicar que la teràpia gènica és un tractament que evitarà que aquests nens visquin aïllats, i és el que també s'ha volgut plasmar amb el títol.





