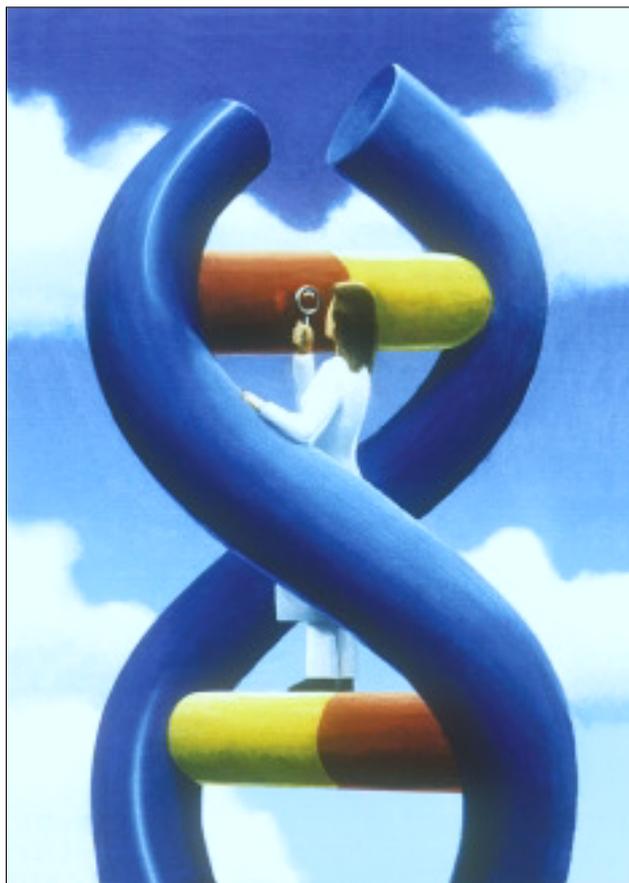


GENÉTICA

Terapia génica para curar la diabetes

SANDRA TORRADES

Bióloga.



La terapia génica para curar la diabetes todavía debe superar algunas barreras en la investigación básica, pero se presenta como una buena alternativa a los métodos convencionales. Mediante la biotecnología se pretende curar la enfermedad restaurando la liberación endógena de insulina o modificando las concentraciones de glucosa en sangre, así como desarrollando distintas estrategias adaptadas a las necesidades de los pacientes con diabetes tipo 1 o 2.

Los distintos tipos de diabetes mellitus, independientemente de su origen, se caracterizan por la incapacidad de las células beta, y de los islotes de *Langerhans* del páncreas, de liberar la cantidad necesaria de insulina en el torrente sanguíneo para mantener los valores de glicemia normal.

Con las terapias actuales, el control de la glicemia no es del todo preciso,

lo que lleva a descompensaciones y trastornos en la salud a largo plazo como retinopatías, neuropatías o enfermedades cardiovasculares.

La terapia exógena de la diabetes no soluciona el problema base de la enfermedad y por esto, la terapia génica pretende «curar» la diabetes mediante la identificación y modificación de los genes implicados en el desarrollo clínico de la enfermedad.

Para introducir un gen en una célula eucariota se utilizan vectores, como los virus o fagos, que son capaces de introducir el material genético que queremos en el interior de las células diana. El ADN o ARN de estos vectores es cortado con enzimas de restricción (proteínas que actúan como tijeras del genoma) con la finalidad de eliminar las regiones patógenas del virus o fago que se

utiliza como vector e insertar el gen de interés terapéutico.

El vector, una vez que haya realizado los procesos de transcripción y traducción de proteínas, terminará generando cantidades importantes de la proteína «normal» que se espera que tenga efectos terapéuticos en el paciente.

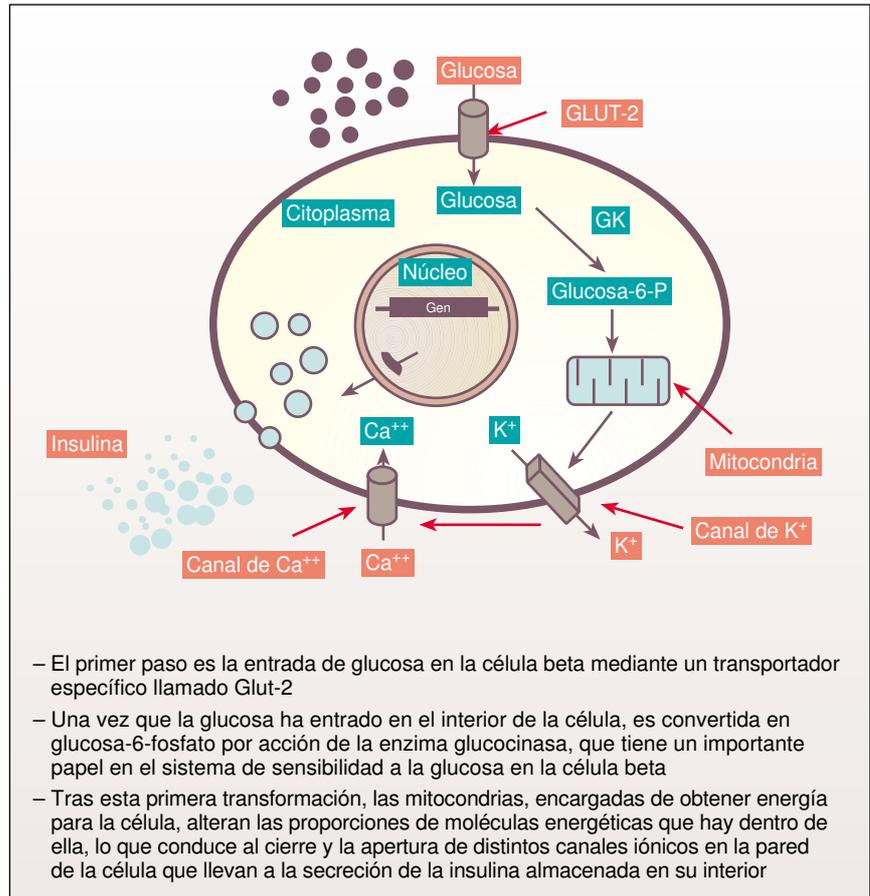
Las modificaciones genéticas en las células diana pueden llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*. La terapia génica *in vivo* consiste en introducir los genes terapéuticos directamente en las células defectuosas del paciente, y aunque sería la terapia ideal, es de momento la que presenta más obstáculos, debido a la dificultad de los vectores de acceder directamente al tejido diana, la potencialidad de generar tumores y la capacidad de mantener esta información genética a través del tiempo y de las generaciones de células. Por su parte, la terapia génica *in vitro* está más desarrollada y consiste en extraer parte de las células afectadas del paciente, o conseguir otras células con potencial terapéutico, cultivarlas en el laboratorio, modificarlas genéticamente, en el caso que sea necesario, y finalmente «trasplantarlas» al paciente.

De momento, la mejor opción de terapia génica para los pacientes diabéticos es generar una fuente de células que produzcan insulina en respuesta a los valores de glucosa y que puedan ser trasplantadas sin la necesidad de utilizar sistemas que supriman la inmunidad de los pacientes.

Estrategias curativas

Son muchos los estudios que se están realizando sobre los mecanismos moleculares y bioquímicos que llevan al desarrollo de la diabetes y en este trabajo se pretende exponer sólo algunas de las posibles estrategias terapéuticas que puede ofrecer la terapia génica para curar la diabetes tipo 1 y 2. Algunas, tienen aplicación para ambos tipos, mientras que otras son específicas de cada variante.

Los estudios que se están realizando pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: promover la formación o regeneración de las células beta o precursores de éstas;



- El primer paso es la entrada de glucosa en la célula beta mediante un transportador específico llamado Glut-2
- Una vez que la glucosa ha entrado en el interior de la célula, es convertida en glucosa-6-fosfato por acción de la enzima glucocinasa, que tiene un importante papel en el sistema de sensibilidad a la glucosa en la célula beta
- Tras esta primera transformación, las mitocondrias, encargadas de obtener energía para la célula, alteran las proporciones de moléculas energéticas que hay dentro de ella, lo que conduce al cierre y la apertura de distintos canales iónicos en la pared de la célula que llevan a la secreción de la insulina almacenada en su interior

Fig. 1. Ruta que integra la señal de glucosa en el exterior de la célula beta con la secreción de insulina.

modular la respuesta metabólica de la glucosa y la secreción de insulina; modificar la resistencia a la insulina que se genera en la diabetes tipo 2, y, finalmente, proteger las células beta y evitar la respuesta autoinmune que destruye de forma irreversible éstas células originando la diabetes tipo 1.

Muchos de los pacientes con diabetes tipo 2 pueden mantener los valores de glucosa mediante la dieta o medicación oral, no obstante, a largo plazo estos pacientes tienen un gradual decrecimiento de la funcionalidad de las células beta asociado a un incremento de glucosa en sangre. Muchos de estos pacientes requieren a largo plazo inyecciones de insulina para mantener las concentraciones de glucosa en sangre y los pacientes con diabetes mal controlada acaban desarrollando complicaciones vasculares parecidas a las de los diabéticos tipo 1.

Aun así, los pacientes con diabetes tipo 2 presentan ventajas respecto a la terapia génica.

En los diabéticos tipo 2 no existe la destrucción autoinmune que podría destruir las células beta trasplantadas, como en el caso de la diabetes tipo 1.

Por otro lado, en contraste con la diabetes tipo 1, los individuos con diabetes tipo 2 tienen algunas reservas de insulina, cosa que aumenta las posibilidades técnicas de la terapia génica en este tipo de pacientes.

Promover la formación o regeneración de células beta

Debido a que la terapia génica *in vivo* presenta aún algunas dificultades técnicas, de momento, la mejor opción parece que es la terapia génica *in vitro*. Para ello se necesita obtener una línea celular estable, es decir, que pueda replicarse de forma indefinida en el laboratorio y después puedan ser trasplantadas al paciente.

Las estrategias que permiten la regeneración o reemplazamiento de las células beta no funcionales serían las más adecuadas para curar la dia-

betes, ya que estas células tienen la compleja «maquinaria» dedicada a mantener el control estricto de los valores de glucosa, que hasta el momento no se ha podido imitar en ningún otro grupo celular.

En definitiva, lo ideal sería encontrar una línea celular que se replicara de forma infinita, en el laboratorio, y que fuera capaz de sintetizar la insulina necesaria para restablecer las concentraciones de glucosa en sangre.

Una buena opción sería el trasplante de células beta maduras para sustituir las no funcionales, pero el principal problema de estas células es el bajo número en que se pueden obtener del tejido adulto y por esto, se requiere cultivarlas *in vitro*, para obtener la cantidad suficiente antes de ser trasplantadas al paciente.

Además, estas células tienen la dificultad añadida de que su capacidad replicativa es limitada. Para superar este obstáculo algunas líneas de investigación están estudiando cómo aumentar su poder replicativo y, para ello, estudian los factores de crecimiento humano de los hepatocitos conocidos como HGF (*human growth factor*).

El principal problema es que al estimular la proliferación parece que pierden parte de su diferenciación, disminuyendo la secreción de insulina.

Una alternativa a las dificultades que presentan las células beta maduras es la utilización de las células progenitoras de éstas.

Las células progenitoras de células beta tienen una alta capacidad replicativa, cosa que facilita el cultivo celular *ex vivo*. Estas células pueden obtenerse de tejidos fetales, como las células madre de origen embrionario (recientemente han originado una fuerte polémica mediática) o células madre del páncreas adulto.

Se necesita conocer los genes implicados en el crecimiento y diferenciación de este tipo de células para obtener líneas celulares capaces de sintetizar la suficiente insulina para restablecer las concentraciones adecuadas de glucosa en sangre.

Desgraciadamente, de momento aún no se ha encontrado el modelo adecuado de células para ser trasplantadas, puesto que las líneas celulares de células beta maduras

son las únicas que sintetizan la suficiente insulina como para generar una respuesta adecuada a la glucosa, pero tienen un bajo poder replicativo, y por el contrario, las células que tienen alta capacidad replicativa, como las células madre, o otros precursores tempranos de células beta, no sintetizan la cantidad suficiente de insulina como para generar una respuesta adecuada.

El problema reside en que las señales de diferenciación celular y las de crecimiento o división son inversamente proporcionales, es decir, si la célula está muy diferenciada tiene poco poder replicativo, mientras que las que tienen alta capacidad replicativa están poco diferenciadas y la síntesis de insulina está por debajo de lo esperado.

Una alternativa a las dificultades que presentan las células beta maduras es la utilización de las células progenitoras de éstas

La utilización de células pancreáticas endocrinas, parece una buena opción, pero su desarrollo también es muy complejo puesto que intervienen numerosos factores extracelulares solubles, una compleja matriz extracelular, interacciones célula-célula y factores de transcripción.

Durante el desarrollo de las células endocrinas inmaduras, uno de los aspectos más curiosos es la expresión múltiple de hormonas en estadios iniciales de diferenciación y que, después al ser adultas, se expresan en menor proporción o simplemente no se expresan.

Por ejemplo, se ha observado que las células endocrinas inmaduras pueden coexpresar dos hormonas distintas, el glucagón y la insulina, pero por el contrario, no se ha descubierto ninguna relación entre esta coexpresión de hormonas y su diferenciación a distintos linajes celulares.

Otros aspectos importantes en el desarrollo de las células beta inmaduras es el papel que desempeña la matriz extracelular y las interacciones célula-célula.

Los factores extracelulares que se encuentran alrededor de las células endocrinas pancreáticas desempeñan un importante papel en la diferenciación celular de las células beta. Por otro lado, se sabe que la interacción célula-célula promueve el desarrollo celular, pero aún no se sabe exactamente cómo.

También se desconocen cuáles son los factores de activación y represión que intervienen en todo el proceso de desarrollo.

Un mayor conocimiento de los genes que codifican para los factores de transcripción implicados en el desarrollo y diferenciación de estas células es de gran importancia, puesto que son posibles dianas terapéuticas.

Actualmente, se están estudiando los genes implicados en la morfogénesis de las células endocrinas inmaduras como el PDX-1, un importante transactivador del gen de la insulina y que, además, también está implicado en la transactivación de otros genes como el gen del transportador de la glucosa GLUT2 y la enzima glucocinasa, implicados en la ruta que integra la señal de glucosa en el exterior de la célula con la consecuente secreción de insulina.

En definitiva, el proceso de desarrollo de las células beta inmaduras a células maduras capaces de secretar insulina resulta de un complicadísimo y delicado juego en el que interviene un gran número de factores externos. Asimismo, se necesita conocer este sistema de desarrollo para que las células precursoras sean una buena alternativa para la terapia génica.

Otra alternativa para el tratamiento de la diabetes tipo 2 es la modificación de células betapancreáticas. Existe una variante de la diabetes tipo 2 conocida como MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), una enfermedad autosómica de herencia dominante que se caracteriza por aparecer en edades tempranas.

En estos pacientes se han encontrado mutaciones en distintos genes, como en el gen de la enzima de la glucocinasa, los genes de factores nucleares de los hepatoci-

tos, (HNF) 1-alfa y (HNF) 4-alfa, y en el gen *PDX-1*.

Las investigaciones básicas pretenden encontrar la relación de estos genes con la diabetes tipo 2, puesto que parecen ser muy buenos candidatos para la terapia génica.

Los múltiples efectos clave del gen *PDX-1* en la funcionalidad de las células beta y los cambios observados en la expresión del gen *PDX-1* en los diabéticos hacen pensar en la hipótesis al que una sobreexpresión de este gen en los islotes pancreáticos de los pacientes con diabetes tipo 2 puede mejorar la respuesta de la glucosa y la secreción de la insulina.

Generación de células no beta productoras de insulina

Como consecuencia de la dificultad para obtener células betapancreáticas, grupos de investigadores han iniciado diferentes trabajos para generar células no beta que secreten insulina en respuesta a los valores de glucosa.

Los investigadores cuentan con una línea celular que se obtuvo a partir de células neuroendocrinas, conocida como AtT20 y que tiene la particularidad de segregar lo que en su interior se sintetiza.

En esta línea celular se le ha introducido el gen de la proinsulina humana y, al ser estimulada por mediadores como el AMPc y el Ca^{+2} a través de un mecanismo muy similar al utilizado fisiológicamente, es capaz de segregar insulina, pero las concentraciones plasmáticas no son las deseadas.

Esto muestra que los objetivos de futuros trabajos están en los elementos reguladores responsables de la producción sensible a las concentraciones sanguíneas de glucosa y liberación normal de insulina a la sangre.

Se están realizando estudios con muchos tipos celulares, pero los más interesantes, y que crean mayores expectativas como potenciales fuentes para crear células productoras de insulina, son los hepatocitos.

En la terapia génica de la diabetes, las células del hígado tienen un potencial muy grande para convertirse en una fuente de insulina

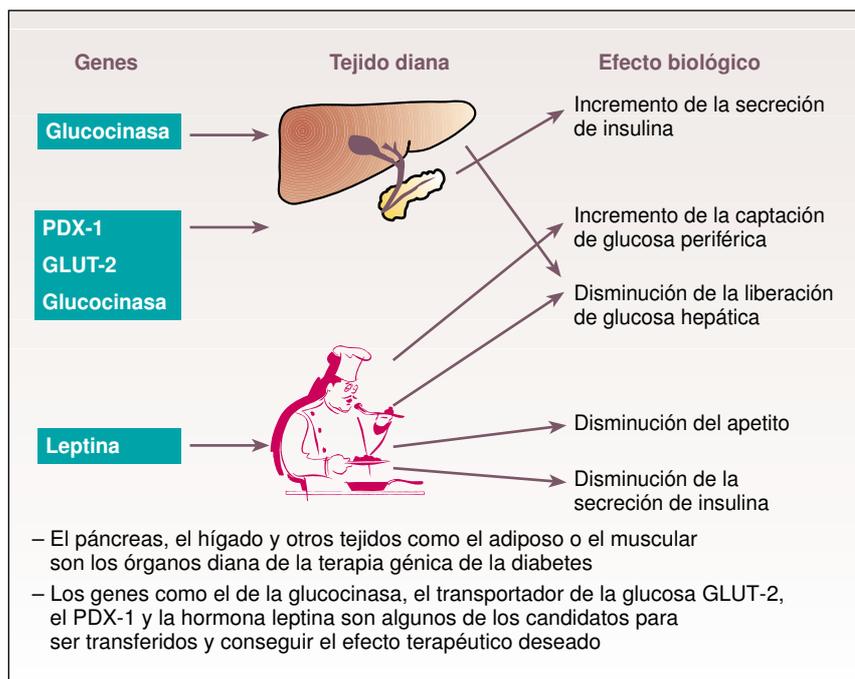


Fig. 2. Terapia génica en pacientes con diabetes tipo 2 y sus posibles efectos biológicos

en respuesta a los valores de glucosa puesto que tienen la capacidad de captar la concentración extracelular de glucosa y comparten con las células beta algunos de los componentes fisiológicos del sistema de detección de glucosa, como la glucocinasa y el transportador de glucosa GLUT-2.

Modificar el sistema inmunitario para evitar el rechazo de las células beta

La terapia génica con la finalidad de modular la reacción autoinmunitario que se produce en los pacientes con diabetes tipo 1, tiene dos objetivos: por un lado, evitar la autodestrucción de las células beta y, por otro, evitar la autodestrucción de células en el caso que puedan ser transfectadas.

Esta vía es seguramente la más compleja, puesto que los procesos implicados en la destrucción masiva de células beta son aún bastante desconocidos y, a pesar de que los primeros abordajes albergan esperanzas en su potencial terapéutico, de momento, no hay ninguna alternativa eficaz para detener la evolución del proceso autoinmune que se genera en la diabetes tipo 1.

Actualmente, se están estudiando distintas estrategias. Por un lado, se pretende inhibir aquellas moléculas

implicadas en el desarrollo de la diabetes tipo 1, como la interleucina 1 beta, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el interferón gamma, la interleucina 6 y el óxido nítrico. Por otro lado, también se pretende prevenir el proceso de inflamación (insulinitis) previa a la destrucción de las células beta. En ratones que desarrollan espontáneamente diabetes tipo 1 se ha observado que estimulando la interleucina 4 se previene la insulinitis.

También se está estudiando la inhibición de la interacción de moléculas Fas/Fas-L, puesto que parece que tienen un importante papel en la destrucción masiva de células beta.

Finalmente, otra estrategia que se está estudiando en células beta modificadas genéticamente es la producción de moléculas anti-CD40-ligando, una proteína que desempeña un papel clave en la activación de los linfocitos T, directamente implicados en el proceso de rechazo autoinmunitario.

Reducir la resistencia a la insulina

Existen dos estrategias para el tratamiento de la resistencia a la insulina que se produce en los pacientes diabéticos tipo 2: la transferencia de genes importantes involucrados

NOMBRE DEL MEDICAMENTO: Hidroxil* B12 - B6 - B1. Las vitaminas a altas dosis no sólo constituyen una terapéutica sustitutiva sino que también adquieren una acción farmacológica peculiar de efectos terapéuticos inusitados. Ello exige la administración conjunta de otras vitaminas con conexión funcional metabólica, por cuanto el empleo aislado de una de ellas puede ocasionar déficits parciales de las demás. Todos estos nuevos conceptos tienen su traducción práctica en el Hidroxil B12 - B6 - B1. Efectivamente, esta asociación triple proporciona beneficios terapéuticos superiores a los obtenidos por suma de los efectos parciales de cada una de ellas. Ello se explica por la intervención simultánea y conjunta en numerosos sistemas enzimáticos (cerebrales, antitóxicos, anabólicos, etc.) lo que unido a las altas dosis utilizadas de cada una de ellas garantiza la eficacia terapéutica en sus múltiples aplicaciones.

COMPOSICIÓN POR COMPRIMIDO: Hidroxocobalamina (DC) clorhidrato 500 mcg, Piridoxina (DC) clorhidrato 250 mg, Tiamina (DC) clorhidrato 250 mg. Excipientes: Copolímero polivinilpirrolidona-polivinil acetato 60/40, carboximetilcelulósico, estearil fumarato sódico, hipromelosa, dióxido de titanio (E-171), glicerol (E-422), talco, etilcelulosa, oleato de sorbitano, lacca roja, croscelam, eritrosina (E-127) y lacca aluminica naranja (E-173).

INDICACIONES: Dadas las múltiples intervenciones en los distintos metabolismos y su actividad polistémica, Hidroxil B12 - B6 - B1 está indicado en: procesos reumáticos del tipo de las artrosis, lumbalgias, reumatismos musculares, polineuritis, ciáticas, radiculitis, síndromes post-encefálicos, post-hemipléjicos, etc. Independientemente de estas indicaciones neurológicas, también es de gran utilidad en otros campos patológicos de la medicina interna y especialidades: anorexia, astenia, miocardosis, arterioesclerosis, hepatopatías, anemias, convalecencias, afecciones dermatológicas (eczema), etc.

EFFECTOS SECUNDARIOS: A las dosis recomendadas es excepcional la presentación de efectos secundarios. Raramente pueden presentarse náuseas, vómitos y erupción cutánea que ceden con la suspensión del preparado. En personas alérgicas a la vitamina B1, pueden aparecer fenómenos de hipersensibilidad. **CONTRAINDICACIONES:** No se debe administrar en personas hipersensibles a la vitamina B1. **ADVERTENCIAS:** IMPORTANTE PARA LA MUJER: Si está usted embarazada o cree que pudiera estarlo, consulte a su médico antes de tomar este medicamento. El consumo de medicamentos durante el embarazo puede ser peligroso para el embrión o feto y debe ser vigilado por su médico. Advertencias sobre excipientes: Este medicamento por contener glicerol como excipiente puede ser perjudicial a dosis elevadas. Puede provocar dolor de cabeza, molestias de estómago y diarrea. **INTERACCIONES:** No se han descrito. **INCOMPATIBILIDADES:** No se han descrito. **DOSIS:** Como dosis promedio de 1 a 3 comprimidos al día. Es preferible que los comprimidos se traguen enteros. **INTOXICACION Y SU TRATAMIENTO:** La administración repetida de vitamina B1 puede provocar en casos raros, la aparición de hipersensibilidad tardía que se combatirá con adrenalina o noradrenalina (en casos graves), o glucocorticoides inyectables, antihistamínicos, etc. En caso de sobre dosis o ingestión accidental, consultar al Servicio de Información Toxicológica. Teléfono 915 620 420.

NOMBRE o razón social y domicilio permanente o sede social del titular de la autorización de comercialización: ALMRALL PRODESFARMA, S.A. General Mitre, 151 08022-Barcelona (España). Presentación y P.V.P. (IVA M.R.): HIDROXIL* B12-B6-B1, envase de 30 comprimidos: 5,89€. Sin receta médica. Especialidad no reembolsable por el Sistema Nacional de Salud. Fecha de revisión: Enero 2003.

BIBLIOGRAFIA: 1. Stracke H. y col. A Benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 (1996) 311-316. 2. Fujii A. y col. Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurotrophic growth. *Gen Pharmacol.* 1996 Sep;27(5):995-1000.

GENÉTICA

en la transducción de señales de la vía metabólica de la insulina y la liberación de hormonas o factores solubles que puedan disminuir la resistencia a la insulina.

El objetivo de la terapia génica en la diabetes tipo 2 es incrementar la captación de glucosa periférica en el músculo y el tejido adiposo y disminuir la liberación de glucosa hepática. Actualmente, mediante la tecnología de transferencia de genes, no es posible introducir *in vivo* un transgén, en un porcentaje elevado, en las células musculares y en las del tejido adiposo. Además, la vía metabólica de la insulina es compleja y los genes que inducen a la resistencia a la insulina aún están por definir.

Otras alternativas que se están estudiando en ratones es inducir la acción de la glucocinasa en el hígado para normalizar el incremento de la producción de glucosa hepática, debido a la deficiencia y resistencia de la insulina.

Para disminuir la resistencia a la insulina existe la posibilidad de transferir genes que codifican para factores solubles. El mejor candidato es la hormona conocida como leptina. Algunos pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 presentan elevadas concentraciones de leptina en plasma y resistencia a ésta. La hormona es segregada por los adipocitos y las células de la mucosa gástrica y es uno de los reguladores más importantes del peso corporal.

Algunos experimentos con esta hormona han demostrado que puede proteger los islotes pancreáticos de la apoptosis inducida por la obesidad y la resistencia a la insulina.

Una vía muy prometedora son los estudios de terapia génica que utilizan vectores adenovirales para introducir el gen de la leptina en modelos animales que han dado una sorprendente reducción en la asimilación de alimentos y del peso corporal, normalizando los valores de insulina y la tolerancia a la glucosa.

Observaciones finales

La terapia génica es una buena alternativa a la administración convencional de insulina para mejorar el control de glucosa en sangre y

evitar los problemas que se originan a largo plazo en los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2.

Aún así, debemos tener presente que, actualmente, la terapia génica presenta muchos obstáculos técnicos y científicos y deberemos esperar unos años para obtener resultados clínicos.

Conseguir una disminución de las incidencias de las complicaciones de la diabetes con los mínimos efectos secundarios debe ser el objetivo.

Existen numerosos genes que pueden ser buenos candidatos para la terapia génica de la diabetes, pero aún no está claro cuál es la mejor alternativa.

Por un lado, los investigadores deberán establecer cuáles son las mejores líneas celulares para cada una de las estrategias terapéuticas génicas y, por otro, deberán realizar un esfuerzo en el conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de estas líneas celulares y, sobre todo, en la diferenciación de éstas, para conocer el papel de aquellos genes involucrados en la síntesis y regulación del metabolismo de la glucosa y la insulina. □

Bibliografía general

Leibowitz G, Levin F. Gene therapy for type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Reviews* 1999;7(2):124-38.

Vinik AI. Ingaps as a cure for diabetes. *Diabetes Institutes Foundation [revista electrónica]*. 2002 marzo [consultado 24/01/03]. Disponible en: <http://www.insulinfree.org/genes/vinik.htm>.

Woo S, Lernmark A, Co-Chairs. Gene therapy approaches for diabetes and its complications [revista electrónica]. 2003 enero [consultado 24/01/03]. Disponible en: http://www.niddk.nih.gov/fund/reports/gene_therapy_summ.htm

Zarante I. Terapia génica. *Medicina [revista electrónica]* 2001 [consultado 20/01/2003]. Disponible en: <http://www.encolombia.com/medicina/sociadadescien/diabetes1201-terapiagen1.htm>.

Figura: Terapia génica de la diabetes [consultado 20/01/03]. Disponible en: http://www.diabetesjuvenil.com/documentos_html/dj_investigacion_3.asp.