

MODUL:**ASSIGNATURA:** Teràpia gènica, cel·lular i tissular**CRÈDITS :** 4-5 Opt/Obl**COORDINADORS
L'ASSIGNATURA:** DE Dra Adela Mazo
Dr. Carles Ciudad
Dr. José Antonio del Río
Dr. Emili Saló

1 OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DE L'ASSIGNATURA

1.1 Justificació de l'assignatura

La Teràpia Gènica constitueix un dels camps de la Teràpia més recents amb grans possibilitats per tractar moltes malalties que tinguin com a base una alteració gènica. Per exemple les cèl·lules poden sobreexpressar certes proteïnes o produir proteïnes no funcionals que donen lloc a una divisió cel·lular descontrolada.

L'objectiu de la Teràpia Gènica és restaurar la producció de proteïnes normals o, alternativament, silenciar gens que codifiquen per productes gènics causants de la malaltia. La primera aproximació requereix introduir al nucli de cèl·lules diana cDNAs amb la seqüència correcta per a produir els productes gènics normals i funcionals, o reparar les seqüències mutades. La segona estratègia consisteix en interferir en el procés d'expressió gènica de gens alterats i evitar la síntesi proteica d'aquests productes, per exemple amb la utilització d'oligonucleòtids o ribozims.

Per tant, el desenvolupament de protocols de Teràpia Gènica requereix per una banda del coneixement de l'origen molecular de la malaltia, i d'altra banda de la capacitat de sintetitzar productes gènics normals o dissenyar mètodes d'interferència en el procés de síntesi de proteïnes defectuoses. Així mateix és crucial el desenvolupament de mètodes per transferir el material gènica terapèutic dins de les cèl·lules. En aquest sentit, clàssicament els vectors per a la transferència gènica s'ha dividit en vectors virals i no virals.

La regeneració cel·lular és un procés biològic bàsic, inicialment associat a la reproducció asexual, que permet la restitució de les parts perdudes o danyades a l'adult en nombrosos grups d'organismes. Aquest procés pot ésser total; és a dir, regenerar un nou organisme complet a partir d'un petit fragment d'un altra organisme, com és el cas a Cnidaris (hidres) o Plathelminths (planàries), o bé parcial, com la regeneració de les parts distals de les extremitats als Amfibis o les espines als peixos. La regeneració cel·lular es pot donar en absència de proliferació cel·lular (morfalaxi) o mitjançant proliferació (epimorfosi). A nivell morfoestructural, els dos aspectes clau de la regeneració són com es manté la polaritat axial (anteroposterior, dorsiventral i proximodistal) i com el patró axial d'estructures es refà de nou. Els gens que controlen ambdós processos semblen ésser els mateixos que controlen el desenvolupament embrionari. Aquest paral·lisme és una font contínua en la recerca de gens homòlegs. Finalment, un aspecte de gran interès rau en saber el perquè hi ha organismes que regeneren i altres que no i en perquè hi ha teixits que regeneren bé i altres que no. Això és particularment interessant en el cas del Sistema Nerviós dels mamífers, entre ells l'home. Per exemple, les diferències que s'estableixen entre teixit nerviós central (p.e., medul·la espinal) o be sistema nerviós perifèric, (p.e., nervis sensitius). A més, el procés de regeneració cel·lular i recuperació cel·lular té un pes molt important en processos de caràcter patològic o degeneratiu cel·lulars en diversos òrgans (malalties coronaries o malalties neurodegeneratives entre d'altres). Una alternativa actual a la incapacitat de regenerar es el us de cèl·lules mare com a possible font de noves cèl·lules de qualsevol teixit que requereixi un recanvi. El coneixements d'aquest conjunt de estratègies es l'objectiu bàsic del curs.

1.2 Objectius :

Conseqüentment, els objectius docents de l'assignatura optativa de Teràpia Gènica inclouen l'estudi detallat de tècniques de DNA recombinant per la producció de construccions virals, tant d'adenovirus com de retrovirus, de sistemes de transferència gènica, i de nous mètodes que puguin aconseguir la reparació gènica. També s'estudiaran casos específics d'aplicacions de la Teràpia Gènica a malalties hematopoètiques, cardiovasculars, metabòliques, de les vies respiratòries, i el càncer. Aquests objectius són complementaris per donar una formació terapèutica moderna als estudiants de la llicenciatura de Farmàcia.

Dins l'apartat de regeneració i teràpia amb cèl·lules mare es descriuran els diferents models clàssics de regeneració en el regne animal. S'estudiarà l'acció de gens reguladors de la regeneració i el desenvolupament amb exemples concrets extrets de la bibliografia recent. Finalment es discutiran les similituds i diferències entre ambdós processos. Clourem la part teòrica amb una descripció de les diferents metodologies emprades per generar cèl·lules mare de diferents teixits. La part pràctica es realitzarà amb Platel·lules (planàries) on s'induiran diferents tipus de regeneracions i transplantaments i amb teixits de vertebrats mitjançant la manipulació de cèl·lules mare neurals.

La Teràpia Gènica cel·lular i tissular es basa en els coneixements de Biologia Molecular, Biologia del Desenvolupament i Enginyeria Genètica pel què és altament necessari tenir cursades prèviament aquestes assignatures.

2 CONTINGUTS, TEMARI I PROFESSORS PARTICIPANTS

2.1 Continguts

Pel que fa a la Teràpia Gènica, el programa les classes teòriques estaran dividides en 3 blocs:

Vectors, Estratègies terapèutiques i Aplicacions a diferents malalties.

2.2.1 Temari teoric

A. Introducció al curso: Conceptes generals y tecnologia de la transferència gènica

*Estratègies terapèutiques: sobreexpressió, silenciament i reparació de gens. Concepte de vector. Tipus de vectors: viral i no virals. Tecnologies ex vivo i in vivo. **(sesión general)***

Sessió 1. Vectors retrovirals en Teràpia Gènica. Components bàsics dels vectors retrovirals. Vectors defectius. Integració dels vectors. Selectivitat d'infecció de retrovirus. Expressió gènica sostinguda amb retrovirus. Teràpia gènica del càncer amb retrovirus. Lentivirus. Estratègies suïcides: HSV-TK. Citosina deaminasa. Citocrom P450 2B1 (CYP2B1). L'efecte adjacent (Bystander). Gap junctions. Combinacions de Teràpia gènica suïcida i amb citoquines. Teràpia suïcida aplicada al càncer. **C. Fillat**

Sessió 2. Vectors Adenovirals i Adeno associats. Biologia dels adenovirus. Estructura. Replicació viral. Construcció i ús de vectors adenovirals. Estudis in vitro i in vivo. Especificitat tissular de la transferència gènica. Resposta del hoste. Teràpia gènica transitòria. Vectors adenovirals avançats: vectors modificats genèticament, CRADS. Aplicacions dels vectors adenovirals. Vectors virals adeno-associats. Disseny i producció de vectors AAV. Propietats i aplicacions dels vectors AAV. **R. Alemany**

Sessió 3. Introducció de material gènic amb polímers. Transferència gènica amb polietilènimina.. **Lipofecció del DNA.** Lípids, DNA i complexos DNA-lípid. Liposomes. Lípids catiónics. Entrada intracel·lular del DNA mitjançant liposomes. Lípids amb PEG. Immunoliposomes. **Tècniques antisentit: Oligonucleòtids i siRNA.** Mecanisme d'acció antisentit. Química dels oligonucleòtids antisentit. Toxicitat. Modificació dels oligonucleòtids. Formulacions liposomals. Utilització d'oligonucleòtids antisentit i si RNAs en càncer. **C. Ciudad**

Sessió 4. Teràpia Gènica en malalties Hematopoiètiques. Transferència gènica en cèl·lules “stem” hematopoiètiques. Granulomatosi crònica. Deficiència d'adenosina deaminasa. Anèmia de Fanconi. Hemofília. Enfermetat de Gaucher. HIV. **J. Barquintero**

Sessió 5. Teràpia Gènica d'errors metabòlics. Mètodes de correcció gènica. Nivells de l'expressió gènica i persistència en el temps. Teràpia Gènica de malalties específiques: Aminoacidopaties, Magatzament lisosomal, Síndrome Lesch-Nyhan, Hipercolesterolèmia familiar. **AM. Gómez-Foix**

Sessió 6. Teràpia Gènica del Càncer. Oncogens i Supresors de tumors: Cas de p53. Teràpia antiangiogènica. Quimioprotecció mediante MDR. Immunoteràpia. Vectors dirigits. Teràpia Gènica del càncer de pit, colon, glioblastoma, hepatoma, melanoma, pulmó, osteosarcoma, ovari, pancreas i pròstata. **A. Mazo**

Teràpia tissular i cel·lular

A) Conceptes generals y tecnologia de la terapia tisular i cel·lular

Sessió- Introducció. Conceptes bàsics. Tipus de regeneració. Origen de les cèl·lules regeneratives. Desdiferenciació *versus* cèl·lules soca. Migració cel·lular.

B) Teràpia amb cèl·lules mare

Sessió7a- Introducció a las cèl·lules mare. Conceptes bàsics. Determinants ètics i legals. Neoblasts de planaries, un exemple únic de cèl·lules mare totipotents, estudi del seu paper durant la homeòstasi i la regeneració.

Sessió 7b- Cèl·lules mare hepàtiques: son necessàries per la regeneració hepàtica?

Sessió 8a. Cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules adultes multipotents. Introducció. Determinants moleculars de la diferenciació de les cèl·lules ES durant el desenvolupament.

Sessió 8b. Cèl·lules mare hematopoètiques, cardíques, del moll del os i del cordo umbilical
Consideracions tècniques: Aïllament i manteniment Diferenciació de les cèl·lules mare. Aplicacions actuals i estratègies futures

Sessió 9. Cèl·lules mare neurals. Cèl·lules multipotents durant el desenvolupament del sistema nerviós. Cèl·lules mare neurals en el cervell adult dels mamífers Consideracions tècniques: Aïllament i manteniment. Diferenciació de cèl·lules mare neurals y caracterització fenotípica. Aplicacions actuals y perspectives

C) Sistemes model de regeneració

Sessió 10- Regeneració a no mamífers. Regeneració a hydra: morfolaxis. Regeneració a planaries: Model mixta epimorfic i morfolactic. Disc imaginals de *Drosophila*. Regeneració d'extremitats a amfibis: Epimorfosis a traves de la desdiferenciació cel·lular

Sessió 11- Regeneració a mamífers: Regeneració hepàtica. Regeneració del Sistema Nerviós . Sistema nerviós central vs perifèric. Determinants moleculars neurals. Estratègies de trasplantament cel·lular i tissular. Estratègies de regeneració axonal en el sistema nerviós adult. Aproximacions farmacològiques a la regeneració neural.

Sessió 12- Control de la proliferació en cèl·lules mare de vertebrats adults

2.3 Professors participants

Coordinació:

Dra Adela Mazo

Dr. Carles Ciutat

Dr. José Antonio del Río

Dr. Emili Saló

Classes teòriques

Dra Adela Mazo
Dr. Carles Ciutat
Dr. José Antonio del Río
Dr. Emili Saló
Dra. Anna M^a Gómez-Foix
Dra. Verònica Noé
Dra. Neus Carbó

Professorat convidat (pendent de confirmació):

Dra. Isabel Fabregat
Dra. Isabel Fariñas
Dr. Eduardo Soriano
Dra. Cristina Fillat (CRG)
Dr. Jordi Barquineró (Hospital Vall d'Hebron)
Dr. Dominique Gallardo (Hospital Vall d'Hebron)
Dr. Jordi Gòmez (CSIC)

Tutoria del treball

Dra Adela Mazo
Dr. Carles Ciutat
Dr. José Antonio del Río
Dr. Emili Saló

3 AVALUACIÓ

3.1 Criteris d'avaluació

Coneixement i aprofitament de les activitats presencials i no presencials per part de l'alumne.

3.2 Procediments de l'avaluació

Per la avaluació es tindran en compte:

- 1- La prova escrita al final de les classes teòriques: 8 punts
- 2- El grau de participació en les practiques i en les discussions: 2 punts

4 RECURSOS D'APRENTATGE I MÈTODES D' ENSENYAMENT

4.1 Ensenyament presencial

L'assignatura té 4/5 Crèdits ECTS, per tant hi ha un treball total del alumnes de 100/125 hores

4.1.1 Classes teòriques

Es faran 20 hores de classes teòriques. Els alumnes tindran que treballar prèviament a la classe llegint una sèrie de capítols de llibre o articles seleccionats per el professorat. Per cada hora de classe presencial aquesta tasca representarà dues hores de treball no presencial per part de l'alumne. Al final de les classes teòriques es realitzarà una prova escrita de qualificació de coneixements de una hora de duració.

Per a la impartició de seminaris especialitzats es comptarà amb la contribució de diferents membres que constitueixen la Xarxa de Teràpia Gènica de Catalunya.

4.1.2 Ensenyament pràctic

En aquest apartat es realitzaran varies activitats:

- Treball presencial per preparar en grups de tres o quatre alumnes una presentació de un treball o article publicat en suport informàtic (p.e., Presentació de diapositives en Powerpoint). La durada de la presentació serà de 10-15 minuts i la seva preparació de 2 hores.
- Presentació oral del treball realitzat davant de la classe i posterior discussió en profunditat del tema durant 1 hora. El nombre de sessions s'ajustarà al nombre o temàtiques aportades pels alumnes.
- Practiques relacionades amb el temari a triar per l'alumne. Temps 10 hores.

El temps total presencial:

classes teoria	20 hores
discussions tutoria	2 hores
presentació oral	1 hora
practica	10 hores
total	33 hores

4.2 PRÀCTIQUES

Teràpia Gènica

1.- Disseny d'oligonucleòtids antisentit. Anàlisi computacional de l'estructura secundària més favorable per a la seva acció. Disseny de RNAs d'interferència (siRNA). Formació de complexos d'oligonucleòtids antisentit amb liposomes catiónics. Anàlisi electroforètic d'oligonucleòtids marcats amb fluoresceïna. Lipofecció de cèl.lules de mamífer amb els complexos generats i detecció de la fluorescència intracel.lular

Pressupost aproximat:

Liposomes: 250 E

Oligonucleòtids fluorescents- 200 E

Reactius electroforesi: 300 E

Medi de cultiu i additius: 300 E

Requeriments: Laboratori dotat de cubetes i fonts per gels d'agarosa. Transil.luminador. Laboratori de cultiu cel.lular que inclogui: Campana de flux laminar, incubador de CO₂ i microscopi de fluorescència.

Màxim: 15 alumnes

Teràpia cèl.lular i tisular

1- Practica Bases cel·lulars del trasplantament (5 hores)

Trasplantament de teixits de planaries a través dels eixos A/P i D/V.

2- Pràctica d'aïllament i diferenciació de cèl·lules mare neurals (5 hores)

Aïllament, manteniment i cultiu de cèl·lules mare neurals. Diferenciació fenotípica.

4.2.1 Treball no presencial

4.2.2 Tasques a desenvolupar

Buscar i llegir la bibliografia per la presentació oral	10 hores
Preparar la presentació oral en plantilles de PowerPoint	10 hores
Presentació oral	1 hora
Prova escrita	1 hora
Total	22 hores

4.2.3 Estudi de l'alumne

Per cada hora de classe presencial es requereixen dues hores de estudi previ i mitja hora de preparació per la prova avaluadora. Això representa 66 hores d'estudi.

El treball total del alumnes es de 121 hores (33 presencials/ 88 no presencials).

Pel professorat, el treball presencial depèn del nombre de alumnes i podria ésser d'un mínim de 45 hores. A part el treball no presencial de preparar la assignatura, els seminaris, les plantilles dirigides als alumnes i sessions de dubtes. Aquestes sessions de dubtes han de estar dirigides a un numero baix d alumnes (4 max) per facilitar el seu desenvolupament.

5 BIBLIOGRAFIA

Cel·lules soca o mare: aspectes tècnics i aplicats

Vats et al., Stem cells. Lancet. 2005 366(9485):592-602.

Regeneració (General)

Wolpert L. (eds). Principles of Development. Oxford University press. (1998) Chapter 13 Regeneration

Regeneració a planaries

Saló, E. *The power of regeneration and the stem cells kingdom: The freshwater planarian Schmidtea mediterranea (Platyhelminth)*. *Bioessays* 28(5):546-559, 2006,

Regeneració a hydra

Bode, H.R. *Trends in Genetics*. 8, 279-284 (1992)

Regeneració de Insectes i amfibis

Johnston L.A (2005). Regeneration and transdetermination: new tricks from old cells. *Cell* 120: 288-290.

Elly M Tanaka (2003) Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:497-501

Regeneració neural i axonal en el sistema nerviós

Tessier-Lavigne M (2005) Wiring the brain: the logic and molecular mechanisms of axon guidance and regeneration. *Harvey Lect.* 2002-2003; 98:103-43.

Ahangf et al., (2005). Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 1:48-64.

Teràpia Gènica

- SMYTH-TEMPLETON, N & LASIC, D.D. *Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, Marcel Dekker, Inc, New York-Basel (2000).

- JEFFREY MORGAN, *Gene Therapy Protocols*, (methods in Molecular Medicine) 2nd ed. Humana Press (2002).

- LATTIME EC, and GERSON SL. *Gene Therapy of Cancer. Academic Press, 2002. Second Edition*

PANNO, J. *Gene Therapy: Treating Disease by repairing Genes, 2004. Facts on File Science Library*

SCHLEEF, M. *DNA Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA vaccination and Immunotherapy, 2005. Wiley-VCH 5*

6 TUTORIES

Dins del apartat de ensenyament pràctic, s'ha presentat una sèrie de tutories per ajudar al alumne en la preparació del treball oral, així com hi hauran hores de consulta per dubtes dels alumnes.