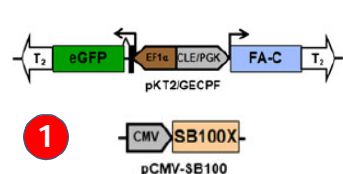


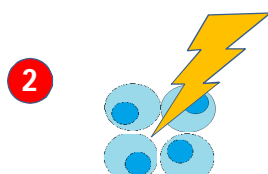
## Introducción

Actualmente la terapia génica se ha convertido en una de las técnicas terapéuticas más prometedoras para la curación de enfermedades. Esta técnica se basa en la introducción de genes terapéuticos en el paciente mediante vectores que pueden ser víricos o no víricos para intentar restablecer el fenotipo normal. Entre los vectores víricos destacan los Adenovirus, los Virus Adeno-Asociados y los retrovirus. Entre los vectores no víricos destaca el ADN desnudo, los plásmidos y los transposones. En el presente trabajo se va a exponer un caso concreto de terapia génica ex vivo mediante transposones, en concreto mediante el sistema llamado **Sleeping Beauty**. Dicho sistema permite integrar un gen terapéutico, en este caso el gen FAN-C, en el genoma de un individuo afectado por anemia de Fanconi tipo C manteniendo de esa forma la expresión continuada del gen FAN-C a lo largo del tiempo.

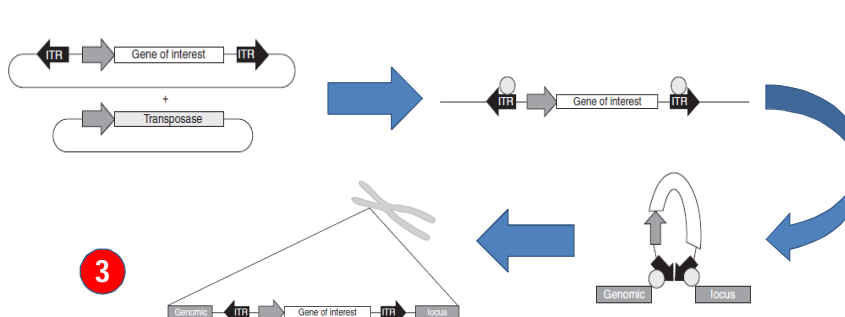
## Metodología



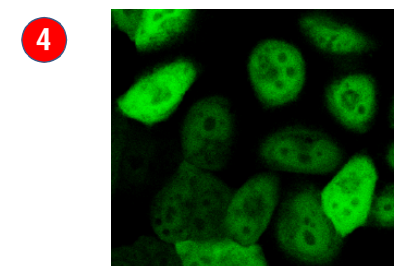
**Construcción del sistema Sleeping Beauty:** El sistema, en configuración *trans* (formado por dos plásmidos) será introducido mediante electroporación en el interior de las células del paciente. El plásmido que contiene la transposasa SB100X (plásmido pCMV-SB100) se transforma junto con el plásmido pKT2/GECPF, que contiene el gen terapéutico FAN-C i el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP), ambos genes controlados por un promotor bidireccional (EF1α-CLE/PGK).



**Electroporación de las células del paciente:** Mediante descargas eléctricas se forman poros en la membrana de las células por los que pueden pasar los plásmidos del sistema Sleeping Beauty.

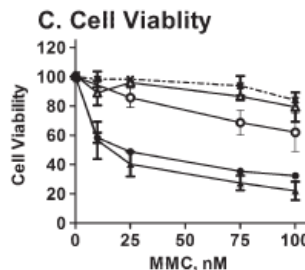
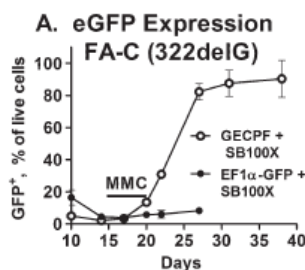
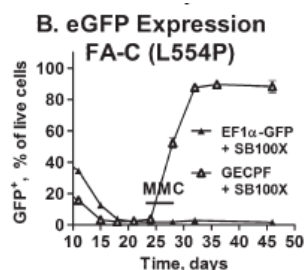


**Integración del gen FAN-C en el genoma de los pacientes con anemia de Fanconi:** Después de hacer la electroporación en las células de los pacientes para introducir los dos vectores que componen el sistema Sleeping Beauty, se espera que éstas sintetizen la proteína funcional. La transposasa codificada por el plásmido pCMV-SB100 reconoce las regiones ITR que flanquean el gen de interés (FAN-C) y permite la escisión y la posterior integración del gen en el genoma del huésped.



**Medida del grado de expresión del transgén:** la construcción que se ha integrado en el genoma contiene el gen de la proteína verde fluorescente, la cual va a indicar si se expresa la proteína y por lo tanto también se expresará, supuestamente, la proteína FAN-C. Posteriormente se mide la viabilidad de las células en un medio con Mitomicina-C.

## Resultados



A y B: Tanto en el paciente A como en el B, las células transformadas muestran una expresión de GFP de hasta el 90% del total de las células en presencia de Mitomicina C, indicando que existe expresión del gen FAN-C (las células presentan resistencia a la Mitomicina-C). C: Mediante el estudio de la viabilidad celular se comprueba que las células han restaurado el fenotipo normal, viabilidad del 70-90% frente a una viabilidad del 20-30% en células FAN-C.

## Conclusiones

- El gen FAN-C terapéutico se integra satisfactoriamente en el genoma de células de pacientes con Anemia de Fanconi tipo C.
- El sistema Sleeping Beauty es un vector no vírico eficaz en terapia génica ex vivo contra la Anemia de Fanconi tipo C.
- Lo económico de su fabricación, la sencillez de su diseño y la baja respuesta inmune que desatan en el huésped hacen del sistema Sleeping Beauty un vector muy indicado para la terapia génica en el futuro, sustituyendo (o complementando) a los vectores víricos tradicionales.
- Actualmente, sin embargo, la mayoría de estudios clínicos se realizan con vectores víricos debido a su alta tasa de eficacia.

## Bibliografía

- Hyland, K. et al. Sleeping Beauty-mediated correction of Fanconi anemia type C. *Journal of gene medicine*, 2011; 13: 462-469
- Marta Swierczek. et al. The Sleeping Beauty transposon system for clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2012) 12(2):139-153