

Catalunya a l'avantguarda en biomedicina

De la genòmica
a la teràpia gènica i cel·lular

Coordinadors:
Luis Serrano
Jordi Sierra
Josep Antoni Bombí



250 anys de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya

Catalunya a l'avantguarda en biomedicina

De la genòmica
a la teràpia gènica i cel·lular

Coordinadors:
Luis Serrano
Jordi Sierra
Josep Antoni Bombí



250 anys de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya



DR. ANTONI ESTEVE
FUNDACIÓ

©2023, Fundació Dr. Antoni Esteve

TORRE ESTEVE

Passeig de la Zona Franca, 109

08038 Barcelona

Telèfon: 93 433 53 20

Direcció electrònica: fundacion@esteve.org

<http://www.esteve.org>

Imatge de la portada: Fundació Dr. Antoni Esteve

ISSN edició impresa: 2385-5053

ISSN edició electrònica: 2385-5061

ISBN: 978-84-124247-4-4

Dipòsit legal: B 8550-2023

Imprès a Espanya

Fundació Dr. Antoni Esteve

La Fundació Dr. Antoni Esteve va néixer per honorar la figura d'aquest farmacèutic, investigador i emprenedor, centrant-se específicament en un element cabdal de la seva personalitat: l'amor i respecte per la ciència. Establerta pels seus fills el 1982, la Fundació és una institució sense ànim de lucre que orienta la seva activitat envers la ciència en general i la farmacoteràpia en particular.

El Dr. Antoni Esteve i Subirana va néixer a Manresa l'any 1902. Llicenciat en farmàcia, era el cinquè boticari d'una nissaga de farmacèutics d'aquesta ciutat. Començà preparant especialitats medicinals a la rebotiga de la seva farmàcia però el creixement

d'aquesta activitat, juntament amb el seu saber científic, el seu esperit industrial i l'entusiasta col·laboració de la seva esposa el dugueren a fundar, el 1929, la que seria una important empresa farmacèutica.

La Fundació promou el debat entre professionals mitjançant l'organització de simposis internacionals, taules rodones i grups de discussió, entorn a la farmacoterapèutica en particular i la ciència en general. Alhora, també contribueix a difondre el treball científic de qualitat atorgant, cada dos anys, el Premi de Recerca Fundació Dr. Antoni Esteve al millor article sobre farmacologia publicat per autors espanyols.

Des de la Fundació també es promou la comunicació científica a través de diferents publicacions. Les *Monografies Dr. Antoni Esteve* resumeixen els continguts de les taules rodones i els Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve abasten temes molt diversos sobre el món de la ciència. Les seves activitats també es veuen reflectides en articles de revistes científiques. Per últim, la col·lecció *Pharmacotherapy Revisited* reproduïx aquells articles que, segons el criteri de científics de prestigi, han estat claus pel desenvolupament d'alguna branca de la farmacoteràpia.

Per altra banda, els cursos de formació de la Fundació Dr. Antoni Esteve volen potenciar competències que no

estan suficientment cobertes als programes de grau universitari. Aquests cursos s'organitzen majoritàriament a Espanya, però també a l'estranger. Una activitat a mig camí entre la docència i la comunicació científica són els *Meet the expert*, trobades entre un científic estranger de particular renom en el seu camp de treball i un grup restringit d'investigadors espanyols.

Finalment, però no menys important, amb aquestes activitats la Fundació col·labora amb diversitat de professionals biosanitaris i comparteix projectes amb universitats, hospitals, societats científiques, altres institucions de recerca i organismes que donen suport a la investigació.

Índex

Presentació	10
Josep Antoni Bombí	
Introducció	12
Luis Serrano i Jordi Sierra	
L'impacte dels projectes post-genòmics en ciències de la salut	14
Roderic Guigó	
Cèl·lules mare del càncer: què hem après fins avui?	18
Anna Bigas	

Diagnòstic de les neoplàsies limfoides. Del microscopi a la seqüenciació de cèl·lules aïllades	22
Elias Campo	
Immunoteràpia dels tumors: dels monoclonals a la teràpia cel·lular	28
Agustí Barnadas	
Teràpia gènica: per fi una opció en clínica	34
Fàtima Bosch	
Teràpia gènica i cel·lular: el camí per fer del laboratori a la capçalera de les persones malaltes	48
Michele Catanzaro	

Autors

Melissa Belló

Laboratorio de Coronavirus del
Centro Nacional de Biotecnología
(CNB-CSIC), Madrid

Agustí Barnadas

Director del Servei d'Oncologia
Mèdica de l'Hospital de la Santa
Creu i Sant Pau, Barcelona
Professor Titular d'Oncologia
Mèdica, Universitat Autònoma
de Barcelona, Barcelona

Anna Bigas

Institut Hospital del Mar
d'Investigacions Mèdiques,
Barcelona
Institut Josep Carreras contra
la leucèmia, Barcelona
Centro de Investigación Biomédica
en Red Cáncer (CIBERONC)

Fàtima Bosch

Centre de Biotecnologia Animal
i Teràpia Gènica, i Departament de
Bioquímica i Biologia Molecular,
Facultat de Veterinària, Universitat
Autònoma de Barcelona, Bellaterra,
Barcelona
Centro de Investigación Biomédica
en Red de Diabetes y Enfermedades
Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)

Elias Campo

Hospital Clínic de Barcelona,
Institut d'Investigacions
Biomèdiques August Pi i Sunyer,
Universitat de Barcelona,
Barcelona

Michelle Catanzaro

Periodista *freelance*, Doctor en Física
i Professor Associat de Periodisme
Científic a la Universitat Autònoma
de Barcelona

Roderic Guigó

Departament de Bioinformàtica i
Genòmica del Centre de Regulació
Genòmica, Barcelona

Presentació

Josep Antoni Bombí

President de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya

És un plaer poder presentar aquesta publicació que per la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya representa una important fita, ja que correspon a l'acte científic que es va fer per celebrar els 250 anys de la seva fundació.

Un acte que va ser tot un repte perquè va coincidir, com és ben conegut, amb la pandèmia de la COVID-19 i vàrem haver d'esperar

dos anys més per poder-lo celebrar amb una certa seguretat sanitària.

En la celebració vàrem voler homenatjar i donar especialment les gràcies a tots els acadèmics que al llarg d'aquests 250 anys han portat la nostra sanitat als elevats nivells de qualitat. Ens va semblar que una de les millors maneres era convidar a participar en l'acte científic a alguns dels importants grups de

professionals i institucions que treballem en recerca al nostre país amb la col·laboració com a conferenciants d'alguns dels seus membres destacats, que porten la recerca a les millors cotes internacionals. Volia ser un també un homenatge a l'important sector de ciències de la vida i la innovació en salut, que amb 93 institucions de recerca i més de 1.300 empreses correspon al 8,7% del PIB català i

promou la BioRegió de Catalunya com un dels principals *hubs* de biomedicina del sud d'Europa.

Com podran llegir a continuació, els participants van dissertar sobre temes ben candents de l'actualitat científica en biomedicina, tant de recerca bàsica com translacional, ja sigui parlant de genòmica i cèl·lules mare com de teràpia gènica i cel·lular. Van ser unes conferències

de molt nivell realitzades per investigadors amb una gran capacitat docent i divulgadora, que van demostrar el gran nivell de la recerca biomèdica al nostre país, i per aquest motiu van deixar plantejades moltes preguntes de cara al futur.

Vull aprofitar aquestes paraules per agrair a la Fundació Dr. Antoni Esteve el patrocini de la sessió i d'aquesta

publicació dins de la seva col·lecció de col·loquis.

Espero que gaudeixin de la lectura i els ajudi a reflexionar sobre els importants avenços que segurament veurem en el camp sanitari en un futur no massa llunyà.

Introducció

Luis Serrano¹ i Jordi Sierra²

¹Professor de la Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) i director del Centre de Regulació Genòmica de Barcelona

²Director del Servei d'Hematologia, Catedràtic d'Hematologia, Universitat Autònoma de Barcelona; membre numerari de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya

El passat 4 de maig de 2022, la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya va organitzar un acte científic dintre de les celebracions del 250è aniversari de la seva fundació. Aquesta commemoració estava planejada per 2 anys abans, el 2020, però la pandèmia pel virus SARS-CoV-2 va truncar els plans i tot es va demorar. La Reial Acadèmia ens va encarregar a tots dos la organització i coordinació de l'esdeveniment científic. Ràpidament ens vàrem posar d'acord en que Catalunya, en molts aspectes, havia estat i és a la avantguarda de molts avenços que configuren la realitat de la ciència mèdica d'aquest segle XXI; de la genòmica a la post-genòmica, de la biologia

cel·lular al diagnòstic i tractament de precisió, de les teràpies immunes a la teràpia gènica de les malalties. Tots aquests desenvolupaments en diferents àmbits de la medicina han suposat una millora en el pronòstic i qualitat de vida dels malalts, qui son els destinataris i la motivació dels esforços dels científics bàsics, translacionals i clínics.

Com a coordinadors de la reunió científica vàrem dissenyar un programa per cobrir els avenços esmentats, i per això vàrem escollir líders de reconegut prestigi, nacional i internacional, de la nostra terra. Sense dubtar-ho, tots ells van acceptar de forma ràpida i entusiasta la nostra invitació.

Roderic Guigó i Serra, coordinador del Departament de Bioinformàtica i Genòmica del Centre de Regulació Genòmica, va tractar el tema *L'impacte dels projectes post-genòmics en ciències de la salut*. Per la seva part, Anna Bigas, directora científica del Centro de Investigación Biomédica en Red de Càncer, ens va mostrar els avenços en el coneixement de la biologia cel·lular de les malalties oncològiques amb la seva conferència *Cèl·lules mare del càncer: què hem après fins avui?* A continuació, Elias Campo, Director del Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer i de la Fundació Clínic de Recerca, va repassar el progrés en el diagnòstic molecular

de les malalties hematològiques; ho va fer com protagonista, ja que el seu grup, juntament amb el de Carlos López Otín de la Universitat d'Oviedo, varen desxifrar el genoma de les cèl·lules de la leucèmia limfàtica crònica. El títol de la seva ponència va ser *Diagnòstic molecular de les neoplàsies hematològiques: de l'electroforesi en gel d'agarosa a la seqüenciació genòmica de cèl·lules individualitzades*. El camp de la teràpia, i més concretament el dels tractaments immunes, el va desenvolupar Agustí Barnadas, Director del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, amb la seva conferència *Immunoteràpia dels*

tumors: dels monoclonals a la teràpia cel·lular. A continuació, el progrés en la manipulació genètica amb finalitat terapèutica va ser tractat per Fàtima Bosch en la seva conferència *Teràpia gènica: per fi una opció en clínica*. Fàtima Bosch és catedràtica de Bioquímica i Biologia Molecular en la Universitat Autònoma de Barcelona i directora del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

Després de les magnífiques exposicions de tots els ponents, que es resumeixen en aquest Quadern, hi va haver un debat d'alt nivell amb el títol *Del laboratori a la capçalera del malalt i d'aquesta a la societat*, moderat per Michele Catanzaro,

doctor en Física per la Universitat Politècnica de Catalunya i especialista en teoria de xarxes complexes, qui ha treballat des de 2001 com a *freelance* per publicacions com *Nature*, *Science*, *Physicsworld*, *Chemistry World*, *The Guardian*, *El Periódico* i *Le Scienze*, entre d'altres.

Creiem que la reunió va assolir l'èxit i l'excel·lència científica que l'efemèrides mereixia. No podem finalitzar sense agrair a la Reial Acadèmia haver-nos distingit amb la coordinació de l'acte i a la Fundació Dr. Antoni Esteve pel seu suport en l'organització.

Barcelona, gener de 2023

L'impacte dels projectes post-genòmics en ciències de la salut

Roderic Guigó

L'any 2001, el president dels Estats Units, Bill Clinton, i el primer ministre del Regne Unit, Toni Blair, anunciaven conjuntament els primers esborranys de la seqüència del genoma humà, un projecte finançat majoritàriament pels National Institutes of Health (NIH) dels Estats Units. Aquests esborranys foren presentats com una fita en la història de la ciència que canviaria per sempre més la manera com enteníem la biologia humana i, en particular, la manera de lluitar contra les malalties. Hom passaria d'una medicina que «detecta i tracta» les malalties a una medicina que «preveu i evita» que les malalties es manifestin.

Aquelles expectatives aviat es demostraren exagerades. A final de la dècada dels noranta, hom acceptava que la seqüència del genoma tenia un valor limitat a l'hora de predir les malalties. La seqüència del genoma d'una espècie específica els trets biològics que defineixen uns organismes, en el cas dels éssers humans, el color de la pell, dels ulls, del cabell, l'alçada, el tipus sanguini, etcètera, i també, efectivament, la

predisposició a patir determinades malalties. Tanmateix, la manera com aquestes instruccions estan codificades en el genoma és molt més complexa d'allò que anticipàvem a principis del mil·lenni, i encara ens és majoritàriament desconeguda en entrar en la seva tercera dècada.

Per tal de maximitzar el valor mèdic de la seqüència del genoma humà, els NIH, en concret el National Human Genome Research Institute (NHGRI), va iniciar projectes de recerca amb dos objectius genèrics principals. El primer d'aquests objectius era caracteritzar la diversitat genòmica humana. Els esborranys publicats a principis dels anys 2000 corresponien a la seqüència d'un únic individu, però persones diferents tenim genomes diferents i es per això que exhibim trets biològics diferents, incloent-hi la predisposició diferent a patir determinades malalties. L'obtenció de la primera seqüència del genoma humà va involucrar centenars de científics, va durar més de 10 anys i va tenir un cost de 3000 milions de

dòlars. Amb la tecnologia disponible a principis dels anys 2000, obtenir la seqüència d'un segon genoma era impossible. Tanmateix, a finals dels anys 2000 es va produir una revolució tecnològica en el camp de la seqüència dels àcids nucleics (la matèria que conforma el genoma) i el cost i l'esforç necessari per obtenir seqüències genòmiques es va abaratir exponencialment. Era possible, per primer cop, obtenir la seqüència del genoma de molts individus.

Un projecte pioner en aquest sentit va ser «el projecte dels 1000 genomes», que es va desenvolupar entre el 2008 i el 2015, i que tenia com a objectiu la caracterització de la variabilitat genòmica de l'espècie humana. Aquest projecte, que no estava associat a l'estudi de cap malaltia en concret, va ser seguit pel International Cancer Genome Consortium (ICGC), el qual tenia com a objectiu obtenir la seqüència del genoma dels tumors en diferents tipus de càncer. Espanya hi va participar amb la seqüenciació del genoma de la leucèmia limfàtica

crònica. Aquests projectes van permetre identificar variants genètiques que ocorren preferentment en diferents tipus de tumors.

L'ICGC és només un exemple de molts altres projectes de seqüenciació genòmica que han identificat variants genètiques associades a malalties particulars, com ara la diabetis, el Parkinson o moltes malalties coronàries. Aquests estudis, que es coneixen com a estudis d'associació al llarg de tot el genoma (GWAS, *genome-wide association studies*), han posat de manifest que la base genètica de les malalties és molt més complexa del que s'esperava. La majoria de malalties més prevalents estan associades a centenars de variants genètiques diferents, cada una de les quals té, sovint, un efecte gairebé imperceptible. A finals de la dècada dels 2010, s'havien descrit gairebé 140.000 associacions entre variants genètiques i malalties. Aquesta informació, tanmateix, és útil per predir la predisposició de cadascú de nosaltres a patir determinades malalties i l'eventual resposta al tractament.

És per això que, a mida que el cost de la seqüenciació genòmica continua reduint-se, molts països han iniciat els anomenats Projectes Nacionals de Medicina de Precisió. L'objectiu d'aquests projectes és incloure la seqüència del genoma en la història clínica dels ciutadans, per tal que sigui utilitzada en la diagnosi

i tractament de les malalties. El Regne Unit és el país que es troba més avançat en aquest sentit. S'hi han seqüenciat més de 100.000 genomes de pacients de càncer o de malalties rares i l'objectiu és arribar a 500.000 genomes l'any 2025. El fet que moltes dades genòmiques siguin obtingudes en el marc dels sistemes nacionals de salut dificulta la recerca científica. Els estudis d'associació (GWAS) són més potents quan més gran és la cohort de pacients que s'estudia, però els sistemes de salut, per motius de confidencialitat, són molt reticents a distribuir les dades dels pacients, encara més fora de les fronteres dels seus països. És per això que han sorgit iniciatives per tal de fer compatible la confidencialitat de les dades dels pacients amb el seu ús en la recerca científica. La més important d'aquestes iniciatives és la Global Alliance for Genomics and Health (GA4GH). La GA4GH desenvolupa estàndards tècnics que permeten compartir dades mantenint-ne la confidencialitat. Una altra iniciativa important, en la qual el nostre país hi juga un paper molt rellevant, és el European Genome-phenome Archive (EGA), una base de dades sofisticada mantinguda conjuntament pel Centre de Regulació Genòmica a Barcelona i l'Institut Europeu de Bioinformàtica a Cambridge, en la qual es deposita tota la informació genòmica que s'utilitza en la recerca biomèdica.

La informació genòmica és particularment rellevant quan està

associada a informació fenotípica. La iniciativa més important en aquests moments és l'anomenat UK BioBank al Regne Unit. Aquest projecte ha reclutat 500.000 voluntaris entre els anys 2006 i 2010, en edats compreses entre els 40 i els 69 anys, i en farà un seguiment durant trenta anys: anàlisis de sang i d'orina, mesures de pes, pressió arterial, ritme cardíac, imatges de ressonància magnètica de la caròtida, ossos, cor, cervell i articulacions, informació sobre l'estil de vida, etcètera. Aquestes dades es creuen amb la informació en la seqüència del genoma per tal d'identificar com la informació genètica afecta el fenotip dels individus al llarg del temps. Es tracta d'una base de dades d'una importància excepcional i ha estat molt rellevant, per exemple, per identificar la base genètica de la resposta diferencial a la infecció amb SARS-CoV-2.

En paral·lel a la caracterització de la variabilitat genòmica en l'espècie humana i de com aquesta afecta els trets biològics dels individus, el segon gran objectiu de la recerca post-genòmica ha estat intentar esbrinar quins són els mecanismes biològics mitjançant el quals la seqüència del genoma determina aquests trets. Els estudis de GWAS són meres associacions estadístiques; simplement ens diuen que una determinada variant genètica està associada a un tret biològic, per exemple el color dels ulls, però no ens diuen la raó perquè

la variant fa que els ulls siguin d'un color o d'un altre. Els estudis encaminats a identificar quines regions són funcionals en el genoma i com funcionen s'anomenen precisament de Genòmica Funcional. Un dels principals projectes en aquesta àrea és l'anomenada *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE), la qual, iniciada l'any 2003, ha tingut una durada de 20 anys. Les dades produïdes per ENCODE han estat crucials per identificar regions en el genoma que tenen rellevància en càncer, malalties autoimmunes i al·lèrgies, malalties neuronals i psiquiàtriques, cardiovasculars, etcètera. Un altre projecte de genòmica funcional molt important és el projecte *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), en el qual s'ha caracteritzat com funciona el genoma en òrgans i teixits diferents,

mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens.

En resum, des de la finalització del projecte original del genoma humà, ara fa més de vint anys, els avenços en la comprensió de la informació genòmica han estat extraordinaris. Hem descobert centenars de milers de variants genètiques implicades en la manifestació i el desenvolupament de les malalties, i hem catalogat els elements en el genoma que confereixen funcionalitat i els òrgans, teixits i condicions en els quals funcionen. Hi ha, tanmateix, una tercera línia de recerca post-genòmica, que fins fa poc semblava, erròniament, més allunyada de l'interès biomèdic. L'espècie humana és només una dels milions d'espècies que habiten la terra, i una àrea de recerca emergent en aquests

moments, la medicina evolutiva, intenta identificar factor genètics implicats en malalties, mitjançant la comparació de la seqüència del genoma de moltes espècies diferents. Per exemple, recentment, mitjançant la comparació del genoma de 400 espècies de vertebrats, hom ha determinat el risc d'aquestes espècies de ser hostes del SARS-CoV-2. En aquests moments, hi ha en marxa una iniciativa, el *Earth Biogenome Project* (EBP), que té com a objectiu l'obtenció de la seqüència del genoma de les aproximadament dos milions d'espècies eucariotes conegudes. El nostre país participa en aquest projecte mitjançant la Iniciativa Catalana per l'EBP (CBP), a través de la qual volem contribuir significativament a un dels projectes més importants de la història de la biologia.

Cèl·lules mare del càncer: què hem après fins avui?

Anna Bigas

Les cèl·lules mare són cèl·lules capaces de donar lloc a tots els tipus cel·lulars del nostre organisme, són totipotents. Des de fa anys existeixen cèl·lules mare es poden generar i cultivar al laboratori i són capaces de donar lloc a gairebé tots els teixits i es diuen pluripotents. Hi ha, però, altres tipus de cèl·lules mare que són específiques de cada teixit i que són difícils de generar o de mantenir in vitro. En el nostre laboratori estudiem com es generen les cèl·lules mare de la sang o hematopoètiques (CMH) durant el desenvolupament embrionari per conèixer quins senyals necessiten i així poder algun dia reproduir aquest procés in vitro, al laboratori.

Estudiar les cèl·lules mare també ens ajuda a investigar com curar el càncer. Actualment, està demostrat que els tumors o leucèmies es mantenen o es reproduïxen mantenint una població que imita a les cèl·lules mare. Són cèl·lules més quiescents, fins i tot adormides, que tenen un gran potencial de proliferació i de supervivència. En el laboratori utilitzem els nostres coneixements sobre les cèl·lules

mare normals per dissenyar noves estratègies de tractament del càncer i la leucèmia.

Cèl·lules mare pluripotents

Les cèl·lules mare embrionàries (CME), també conegudes com a cèl·lules mare pluripotents (CMP), són línies cel·lulars derivades de la massa cel·lular interna de blastocists^{1,2}. Es cultiven en condicions específiques que preserven la seva capacitat d'autorenovació. Una font no embrionària de cèl·lules PSC es pot obtenir reprogramant cèl·lules somàtiques mitjançant la introducció de factors de transcripció específics (Sox2, Oct4, myc, klf4) que induïxen la pluripotència³. Un cop reprogramades, les PSC induïdes (iPSC) encara són pluripotents amb característiques gairebé idèntiques a les PSC. Ambdós tipus de PSC poden ser induïdes a diferenciar-se cap a qualsevol tipus cel·lular sota condicions específiques⁴.

La pluripotència o la capacitat de diferenciar-se en diferents llinatges es pot avaluar in vivo mitjançant la formació de teratomes en injectar les

PSC en receptors murins; o in vitro, definint els senyals adequats (citoquines o petites molècules) que activen diferents vies de senyalització i generen tipus cel·lulars «a la carta». Les possibilitats que ofereixen aquestes cèl·lules per generar productes cel·lulars terapèutics són molt grans. Durant anys, els investigadors han intentat imitar el desenvolupament in vivo de les CMH a partir de precursors hemogènics (HE) i mesodèrmics mitjançant la incubació amb factors específics. La majoria de les condicions condueixen a la generació de cèl·lules hematopoètiques que s'assemblen a l'ona primitiva, la que només genera cèl·lules diferenciades però no cèl·lules mare.

Les cèl·lules pluripotents poden formar cossos embrionaris, que són estructures 3D que s'assemblen als embrions primerencs, constituïdes per cèl·lules multipotents i diferenciades de les tres capes germinals. Actualment s'ha desenvolupat un tipus d'estructura 3D que té un alt nivell d'organització cel·lular semblant als embrions i que

s'anomena gastruloid⁵. Els gastruloides són organoides embrionaris resultants de l'agregació d'un nombre precís de PSC que, en condicions de cultiu definides, desenvolupen una organització que imita l'embrió primerenc dels mamífers. Després de 7 dies de cultiu, els gastruloides procedents de cèl·lules pluripotents de ratolí desenvolupen una complexa organització espacial amb derivats de les tres capes germinals disposats respecte a tres eixos ortogonals d'una manera que reflecteix l'organització de l'embrió de ratolí a E9.5. Els gastruloides manquen de cervell i de teixits extraembrionaris, però contenen progenitors dels altres òrgans i teixits del cos.

Les cèl·lules mare hematopoètiques

Les CMH donen lloc a diferents tipus de progenitors intermedis que formen tots els tipus de cèl·lules sanguínies als organismes adults. No obstant això, durant el desenvolupament embrionari, la jerarquia hematopoètica és diferent i hi ha una hematopoesi independent de les CMH⁶.

En els vertebrats, es produeixen tres onades hematopoètiques a l'embrió després de la gastrulació: 1) a la primera onada es formen eritròcits, macròfags i megacariòcits primitius per sostenir el requeriment inicial d'oxigen i la remodelació dels teixits; 2) a la segona onada es formen progenitors eritroides i mieloides (EMP), que es convertiran en

macròfags residents al teixit de llarga durada; 3) i a la tercera té lloc a la regió aorta-gònada-mesonefros (AGM) i es produeix la detecció de les primeres CMH amb capacitat de regeneració sanguínia in vivo després del trasplantament. Les cèl·lules de la segona i tercera onada es generen a partir d'un subtipus especialitzat de cèl·lules endotelials anomenat endoteli hemogènic. Poc després de la seva formació, les CMH migren al fetge fetal, on s'autoregeneren activament i adquireixen característiques de CMH definitives/adultes.

Les CMH són la font de trasplantament per a diferents indicacions terapèutiques en què cal substituir el sistema hematopoètic.

A causa de la rellevància clínica d'aquestes aplicacions, i de la manca de donants compatibles HLA per a alguns pacients, hi ha un gran interès en la generació d'aquestes cèl·lules in vitro. Entendre els esdeveniments que guien l'especificació de les CMH és crucial, no sols per a fins de medicina regenerativa, sinó també per a una millor comprensió de la transformació leucèmica. En aquest sentit, és important dissecionar les vies de senyalització implicades en l'especificació de les CMH i com la seva desregulació pot conduir al desenvolupament de diferents tipus de leucèmia. S'han descrit diferents vies de senyalització que són crítiques per a una formació adequada de les CMH a la regió AGM⁷. En particular, s'ha descrit que

les vies WNT/ β -CATENINA, HEDGEHOG, BMPs/SMADs, JAK/STATs, àcid retinoic, Notch i les vies inflammatòries convergeixen i activen les proteïnes de remodelació de la cromatina i els factors de transcripció que regulen el procés de transició endotelial-hematopoètica.

Les vies de senyalització del desenvolupament poden influir en la quantitat de conversió d'EHT, però el més rellevant és que la seva activitat ha d'estar regulada estretament per obtenir CMH sanes. Per exemple, les cèl·lules que se sotmeten a l'EHT requereixen l'activitat de Notch, això no obstant necessiten reduir els nivells d'activació en comparació amb les veïnes endotelials⁸.

En aquest escenari específic, la sobreactivació o la inactivació de Notch resulta en l'eliminació del procés de generació de CMH. Els nivells d'activitat de Notch estan altament regulats pels lligands de Notch, Jagged1 i Delta-like 4 i la seva interacció amb el receptor Notch. De la mateixa manera, l'activitat de Wnt/catenina és necessària en un moment molt específic de la formació de les CMH i no ho és després⁹. Les BMP/SMAD són una altra via activa a l'EHT primerenca; de l'activitat de les CMH a l'AGM quan es tracta tant amb l'activador de BMP4 com amb l'inhibidor de BMPER¹⁰. Totes aquestes vies haurien de convergir en l'activació de set factors de transcripció (heptad) necessaris per a

les CMH (SCL, LYL1, LMO2, GATA2, RUNX1, ERG i FLI-1).

En resum, hi ha molts senyals de desenvolupament que són importants en l'especificació d'EHT i CMH, però, tots ells han d'estar estretament regulats i coordinats a la mateixa cèl·lula per produir un CMH, creant possiblement una estocasticitat molt ajustada que podria explicar la raresa d'aquest esdeveniment.

Les cèl·lules mare tumorals o leucèmiques

Aquestes vies de senyalització són també rellevants en els processos tumorals i en molts casos els gens implicats són oncogens importants. És el cas de Notch, que en leucèmia limfoblàstica aguda de tipus T (LLA-T) és un dels oncogens *drivers* més freqüents. En el nostre laboratori hem vist com l'activació aberrant de Notch té una incidència directa sobre

el número de cèl·lules iniciadores de leucèmia T en un model de ratolí¹¹.

Això ens permet buscar tractaments complementaris que puguin erradicar aquestes cèl·lules com hem fet en el cas de Wnt. Recentment també hem identificat els gens que regulen la via de Wnt en LLA-T i hem vist que estan implicats en la resistència a la quimioteràpia.

Més concretament, hi ha una firma de gens regulats per Wnt que ens poden identificar els pacients que no respondran a la quimioteràpia i que com a conseqüència tenen més mal pronòstic¹². En altres estudis, hem investigat les mutacions existents en les cèl·lules de recaiguda de pacients de LLA-T per identificar aquells canvis en el DNA que poden afavorir l'existència d'aquestes cèl·lules¹³.

No només en leucèmies són importants els programes embrionaris que regulen les cèl·lules

mare. En càncer de còlon, junt amb el nostre col·laborador Dr. Lluís Espinosa, hem identificat una firma de gens que s'expressen en l'intestí embrionari i que quan els trobem expressats en càncer de còlon ens poden identificar pacients amb pitjor pronòstic. Aquestes cèl·lules amb firmes embrionàries tenen una capacitat més gran d'entrar en un estat quiescent en resposta a la quimioteràpia i així sobreviure al tractament¹⁴.

En resum, les cèl·lules mare ens poden proporcionar grans oportunitats terapèutiques per tractar diverses malalties en les quals es necessiti la regeneració de teixits i al mateix temps ens ajuden a entendre el càncer i com buscar noves estratègies terapèutiques per evitar la supervivència de les cèl·lules tumorals.

Referències

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
4. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008;132:661-80.
5. van den Brink SC, Alemany A, van Batenburg V, Moris N, Blotenburg M, Vivie J, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids. *Nature*. 2020;582:405-9.
6. Dzierzak E, Bigas A. Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell Stem Cell*. 2018;22:639-51.
7. Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a005975.
8. Gama-Norton L, Ferrando E, Ruiz-Herguido C, Liu Z, Guiu J, Islam AB, et al. Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nat Commun*. 2015;6:8510.
9. Ruiz-Herguido C, Guiu J, D'Altri T, Ingles-Esteve J, Dzierzak E, Espinosa L, et al. Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/beta-catenin activity. *J Exp Med*. 2012;209:1457-68.
10. McGarvey AC, Rybtsov S, Souilhol C, Tamagno S, Rice R, Hills D, et al. A molecular roadmap of the AGM region reveals BMPER as a novel regulator of HSC maturation. *J Exp Med*. 2017;214:3731-51.
11. Gekas C, D'Altri T, Aligue R, Gonzalez J, Espinosa L, Bigas A. Beta-catenin is required for T-cell leukemia initiation and MYC transcription downstream of Notch1. *Leukemia*. 2016;30:2002-10.
12. García-Hernández V, Arambilet D, Guillén Y, Lobo-Jarne T, Maqueda M, Gekas C, et al. β -Catenin activity induces an RNA biosynthesis program promoting therapy resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *EMBO Mol Med*. 2023 Jan 4;e16554. doi: 10.15252/emmm.202216554. Online ahead of print.
13. Sentis I, González S, Genesca E, García-Hernández V, Muinos F, González C, et al. The evolution of relapse of adult T cell acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol*. 2020;21:284.
14. Sole L, Lobo-Jarne T, Álvarez-Villanueva D, Alonso-Maranon J, Guillén Y, Guix M, et al. p53 wild-type colorectal cancer cells that express a fetal gene signature are associated with metastasis and poor prognosis. *Nat Commun*. 2022;13:2866.

Diagnòstic de les neoplàsies limfoides. Del microscopi a la seqüenciació de cèl·lules aïllades

Elias Campo

Les neoplàsies limfoides són un grup molt heterogeni de tumors derivats de cèl·lules del sistema immune, fonamentalment limfòcits B i T, en diverses fases de la seva diferenciació i activació. Estudis epidemiològics internacionals mostren que la freqüència global d'aquests tumors es va incrementar a pràcticament tot el món en les dues últimes dècades del segle passat amb una tendència més recent a l'estabilització. La causa d'aquesta variació no és ben coneguda però una part fonamentalment d'aquest augment es pot relacionar amb la gran pandèmia de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana que facilitava el desenvolupament de limfomes agressius. Els estudis epidemiològics també mostren que en les dos últimes dècades s'observa un descens en la mortalitat global per aquest tipus de tumors. Un efecte

que s'atribueix a la millora dels tractaments que per altra banda requereixen un diagnòstic més precís per poder adoptar les mesures més adients amb els malalts.

La conducta biològica i clínica de les neoplàsies limfoides és molt diversa i varia des de tumors molt indolents que poden no necessitar tractament durant molt anys sense comprometre la vida normal del pacient fins a tumors extraordinàriament agressius amb perill de la vida del pacient que requereixen un tractament immediat. L'actual classificació de les neoplàsies limfoides reconeix més d'un centenar d'entitats diferents i les seves variants, cada una d'elles amb peculiaritats morfològiques, fenotípiques, moleculars i clíniques¹. El correcte diagnòstic d'aquestes malalties és clau per poder definir el tractament apropiat per cada malalt.

Aquesta decisió és rellevant donat que amb el tractament adequat es poden curar entre el 60-90% d'alguns dels tumors més agressius però, per altra banda, aquests tractaments no estan exempts de possibles efectes secundaris que cal evitar en els pacients que poden requerir mesures menys intenses o inclús no necessitar un tractament immediat. L'element clau per un correcte tractament és establir amb precisió el diagnòstic anatomopatològic de cada malalt.

Evolució del diagnòstic en neoplàsies limfoides

Clàssicament, el diagnòstic anatomopatològic s'ha basat en el reconeixement microscòpic de les alteracions histopatològiques dels teixits neoplàsics. El diagnòstic de les neoplàsies limfoides abans dels anys 1980 es basava en conceptes

molt simples com la mida cel·lular (cèl·lules grans o petites) i el seu patró de creixement en forma de nòduls o destruint difusament l'estructura dels ganglis limfàtics. El descobriment de la complexitat del sistema immunitari amb limfòcits B i T, el seus canvis en la morfologia durant l'activació, la seva diferent distribució en regions específiques dels òrgans limfoides i la seva fisiologia particular van fer necessari aplicar aquests conceptes a la interpretació de tumors derivats d'aquestes cèl·lules. És sorprenent com utilitzant el humil microscopi òptic i unes poques tincions histoquímiques, patòlegs com Karl Lennert a Alemanya i el Robert Lukes als Estats Units van relacionar la variable histopatologia de les neoplàsies limfoides amb les diverses fases de la diferenciació dels limfòcits i inclús van reconèixer limfomes derivats de limfòcits B i T aplicant tècniques de la immunologia en els teixits². Tanmateix, la simple morfologia té limitacions rellevants, ja que tumors amb característiques similars al microscopi poden tenir evolucions clíniques molt diferents. Un exemple és el del limfoma fol·licular o el limfoma de cèl·lules del mantell. Els dos tenen cèl·lules petites amb nuclis irregulars i poden créixer formant nòduls però la seva conducta clínica és extraordinàriament diferent amb una mitjana de supervivència dels malats amb els tractaments actuals de més de 9 anys en el primer cas

i de 4-5 anys en el segon. L'aproximació terapèutica ha de ser molt diferent.

El desenvolupament en la dècada dels anys 1980 de tècniques que permetien identificar en els teixits o en cèl·lules en suspensió proteïnes específiques per mitjà d'anticossos marcats amb elements fluorescents o colorimètrics va ampliar extraordinàriament la capacitat diagnòstica. Aquestes tècniques immunohistoquímiques o de citometria de flux podien identificar desenes d'elements que caracteritzen el fenotip d'aquests tumors i proteïnes oncogèniques que defineixen amb precisió el tipus tumoral. També permeten caracteritzar activitats biològiques com la capacitat proliferativa que es relacionen més precisament amb la conducta clínica dels mateixos.

El descobriment del càncer com una malaltia genètica i la presència d'alteracions cromosòmiques específiques en determinats tumors va suposar un estímul per incloure l'anàlisi citogenètica de forma rutinària en el diagnòstic de les neoplàsies hematològiques en general³. En aquesta línia es van desenvolupar sondes d'ADN marcades amb fluorocroms que faciliten la visualització en els teixits i cèl·lules neoplàsiques d'alteracions com translocacions, delecions i amplificacions per mitjà de la hibridació in situ fluorescent. D'aquesta manera, el microscopi va permetre establir el diagnòstic

integrant la morfologia del tumors, canvis moleculars a traves de la seva expressió proteica i pertorbacions genètiques.

El desenvolupament de les tècniques de la reacció en cadena de la polimerasa juntament amb la seqüenciació de l'ADN van introduir el diagnòstic molecular en l'anatomia patològica en els anys 1990. Aquestes tècniques permeten determinar si una població cel·lular de limfòcits B o T és clonal o policlonal, una informació que, si bé no és determinant, és de gran ajuda en el diagnòstic diferencial dels limfomes i processos inflamatoris molt exuberants que poden imitar neoplàsies.

El coneixement genòmic, nous reptes i perspectives

El desenvolupament del Projecte del Genoma Humà i la seva primera publicació el 2003 va possibilitar el disseny de noves tecnologies per analitzar globalment alteracions en l'estructura i expressió del conjunt dels gens d'un organisme⁴. Aquestes metodologies basades fonamentalment en els denominats *microarrays*, petites plataformes en les quals s'imprimeixen tots els gens humans a estudiar, han permès descobrir nous tipus tumorals, crear nous models pronòstics i han identificat noves vies i possibles dianes terapèutiques. Tanmateix, no han trobat una manera d'incorporar-se a la pràctica clínica.

La nova generació de tecnologies de seqüenciació del DNA ha revolucionat la identificació d'alteracions genòmiques en les malalties, particularment en càncer, al poder llegir de forma complerta un genoma en un temps relativament curt i a preus assequibles. Per altra banda, l'adaptació d'aquestes tecnologies per la lectura de regions més o menys extenses del genoma ha facilitat la seva incorporació a la rutina de la practica clínica en àmbits del diagnòstic i la identificació de possibles dianes terapèutiques. L'any 2008 es va publicar el genoma complet d'una malaltia neoplàsica, una leucèmia aguda mieloblàstica, descobrint noves mutacions oncogèniques i obrint així aquestes tecnologies a l'estudi del càncer⁵. La possibilitat d'elucidar de forma exhaustiva les alteracions genòmiques del càncer era un projecte ingent que es va desenvolupar a través de la creació del Consorci Internacional del Genoma del Càncer, un model paradigmàtic de treball col·laborador per abordar les noves perspectives i desafiaments que plantejava la seqüenciació de

genomes complets i la seva aplicació a un problema de salut (<https://icgc.org/>)⁶.

El Ministeri de Ciència espanyol va obrir una convocatòria per participar en aquest consorci que finalment va resoldre a favor del Consorci del Genoma de la Leucèmia Limfàtica Crònica que vam dirigir amb el professor Carlos López-Otín de la Universitat d'Oviedo. El projecte era un desafiament logístic i conceptual d'una immensa envergadura i sense experiència prèvia al nostre país (www.cllgenome.es). Vam iniciar els treballs el març de 2009 amb la participació d'investigadors de 17 institucions espanyoles. Aquest projecte ens va obrir també les portes a participar en el projecte de l'Epigenoma Humà, particularment en l'estudi de l'epigenoma de les cèl·lules hematopoètiques i tumors limfoides⁷. Després de vuit anys d'intens treball vam poder seqüenciar el genoma de més de 500 pacients i identificar més de 60 nous gens mutats implicats en la malaltia i descoberts per primera vegada en algun tipus de càncer^{8,9}. Es van desenvolupar noves eines bioinformàtiques per a l'anàlisi dels

genomes i es van definir noves directrius bioètiques per a la generació i utilització de la informació genòmica. També vam poder definir els primers epigenomes complets de les diferents cèl·lules limfoides B normals en totes les fases maduratives i la seva comparació amb l'epigenoma de la leucèmia limfàtica crònica i altres tipus de neoplàsies limfoides^{10,11}. Gràcies a l'impuls d'aquest projecte vam poder iniciar l'anàlisi genòmic d'altres neoplàsies limfoides i poc a poc traslladar aquesta informació i metodologia a la pràctica clínica. En aquests moments forma part ja de la rutina diagnòstica la seqüenciació de panells entre varies desenes a centenars de gens. La detecció de mutacions específiques permet el diagnòstic diferencial entre tumors amb característiques patològiques similars i identifiquen alteracions que determinen tractaments diferents i que prediuen la resistència a determinats fàrmacs¹². En alguns tipus de neoplàsies hematològiques, com les leucèmies agudes, ja es recomana la seqüenciació complerta del genoma en la rutina clínica ja que permet identificar tot tipus d'alteracions en una mateixa prova

amb implicacions en el tractament dels malalts¹³.

La nova frontera: la seqüenciació del genoma i del transcriptoma de cèl·lules aïllades

En els últims anys s'han desenvolupat tècniques que permeten la seqüenciació del transcriptoma i de zones seleccionades del genoma en cèl·lules aïllades¹⁴. Aquesta possibilitat ha promogut un esforç internacional per la creació d'un atlas complet de totes les cèl·lules de l'organisme humà amb una resolució inèdita (<https://www.humancellatlas.org>)¹⁴. Aquests estudis ja han identificat noves cèl·lules i estats funcionals de múltiples òrgans prèviament desconegudes. Per altra banda, l'aplicació d'aquestes tecnologies en neoplàsies limfoides comença a evidenciar la gran complexitat dels tumors tant en les pròpies cèl·lules neoplàsiques com en les cèl·lules del seu microambient¹⁵. Aquests estudis permeten també refinar l'anàlisi de l'evolució clonal dels tumors i els canvis que ocorren en les cèl·lules després del tractament amb l'emergència de subclons resistents.

La comparació de les cèl·lules neoplàsiques amb les seves contrapartides normals permet identificar canvis específics que poden ajudar en el diagnòstic i tractament.

Recentment hem pogut estudiar l'evolució de la leucèmia limfàtica crònica seqüenciant més de 5000 cèl·lules aïllades en diferents moments de la malaltia des de els seus inicis indolents a la progressió tumoral, la recaiguda després de diversos tractaments i la seva transformació a un limfoma de cèl·lules grans molt agressiu (transformació de Richter)¹⁶. Un dels resultats més sorprenents ha estat el poder identificar, ja en el moment del diagnòstic, les cèl·lules que donen lloc a les recaigudes i a la transformació en l'evolució posterior fins a 19 anys més tard. Aquestes cèl·lules, que podem dir són les llavors d'aquestes complicacions posteriors, ja tenen el perfil d'expressió i les alteracions genòmiques pròpies des de l'inici de la malaltia. Sembla que la cèl·lula mare que ha donat lloc a la leucèmia ha generat múltiples cèl·lules filles amb alteracions genètiques que

aniran manifestant-se en el futur. També hem pogut identificar que aquestes cèl·lules tan agressives depenen d'un increment en el metabolisme de la fosforilació oxidativa. Aquest fenomen és al mateix temps una vulnerabilitat que podem aprofitar pel tractament, ja que les cèl·lules deixen de créixer quan inhibim aquesta via metabòlica. Aquestes observacions permeten preveure que en el futur proper podrem aplicar aquestes tècniques en la pràctica clínica i detectar amb gran sensibilitat cèl·lules amb propietats particulars que facilitaran el diagnòstic, preveure l'evolució de la malaltia i possiblement orientar millor el tractament més adequat.

En conclusió, hem vist com el diagnòstic de les neoplàsies limfoides, i en general de tot tipus de càncer, es beneficia del desenvolupament tecnològic que permet conèixer millor la biologia de les cèl·lules tumorals. D'aquesta manera, el diagnòstic no solament identifica tumors específics i les seves variants sinó que també aporta informació clau per predir la seva evolució i definir els millors tractaments possibles.

Referències

1. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martínez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140:1229-53.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112:4384-99.
3. Rowley JD. Genetics. A story of swapped ends. *Science*. 2013;340:1412-3.
4. Campo E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms – current contributions and future hopes. *Mod Pathol*. 2013;26(Suppl 1):S97-S110.
5. My genome. So what? *Nature*. 2008;456:1.
6. International Cancer Genome Consortium; Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010;464:993-8.
7. Adams D, Altucci L, Antonarakis SE, Ballesteros J, Beck S, Bird A, et al. BLUEPRINT to decode the epigenetic signature written in blood. *Nat Biotechnol*. 2012;30:224-6.
8. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101-5.

9. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526:519-24.
10. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44:1236-42.
11. Kulis M, Merkel A, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, Castellano G, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet*. 2015;47:746-56.
12. Mansouri L, Thorvaldsdottir B, Laidou S, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Precision diagnostics in lymphomas – recent developments and future directions. *Semin Cancer Biol*. 2022;84:170-83.
13. Rosenquist R, Cuppen E, Buettner R, Caldas C, Dreau H, Elemento O, et al. Clinical utility of whole-genome sequencing in precision oncology. *Semin Cancer Biol*. 2022;84:32-9.
14. Rozenblatt-Rosen O, Stubbington MJT, Regev A, Teichmann SA. The Human Cell Atlas: from vision to reality. *Nature*. 2017;550:451-3.
15. Bühler MM, Martín-Subero JI, Pan-Hammarström Q, Campo E, Rosenquist R. Towards precision medicine in lymphoid malignancies. *J Intern Med*. 2022;292:221-42.
16. Nadeu F, Royo R, Massoni-Badosa R, Playa-Albinyana H, García-Torre B, Durán-Ferrer M, et al. Detection of early seeding of Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 2022;28:1662-71.

Immunoteràpia dels tumors: dels monoclonals a la teràpia cel·lular

Agustí Barnadas

El càncer agrupa un ampli ventall de malalties i representa ser la segona causa de mort en els països desenvolupats. En augmentar l'esperança de vida de la població, la incidència d'aquestes malalties ha anat augmentant progressivament¹. La patogènesi dels tumors és complexa i és el resultat d'un procés de múltiples etapes en què les cèl·lules d'un teixit adquireixen la capacitat de ser tumorigèniques i finalment acaben transformant-se en cèl·lules malignes, algunes d'elles amb capacitat de poder disseminar. En aquest procés intervenen l'activació constant de vies que estimulen la proliferació cel·lular, la capacitat d'evitar els senyals supressors del creixement i de la mort cel·lular, l'estimulació de l'angiogènesi i de la disseminació metastàsica, així com també la reducció de la resposta immunològica, la inestabilitat genòmica i la inducció de processos inflamatoris en el llit tumoral².

El tractament del càncer depèn de cada localització i del volum de la malaltia. Quan la malaltia és limitada, usualment es fonamenta en un tractament local amb cirurgia i/o radioteràpia, associat a tractament sistèmic amb quimioteràpia, teràpia endocrina (quan el tumor té criteris de sensibilitat a tractaments hormonals) i en alguns casos amb teràpia dirigida. Quan existeix metàstasi, el tractament inicial acostuma a ser una teràpia sistèmica segons cada localització i les característiques biològiques de la malaltia, en forma de quimioteràpia, teràpia dirigida o teràpia immunològica. Tots els tractaments no estan exempts de poder produir efectes adversos que a voltes poden condicionar la qualitat de vida dels pacients, donat que algun d'ells poden ser permanents, com és el cas de pèrdua d'estructures després d'un procediment quirúrgic, o de fibrosi després d'una irradiació, o bé toxicitat dels nervis sensitius,

cardiotoxicitat associada a determinats citostàtics, entre d'altres. Malgrat realitzar un tractament amb intenció curativa, malauradament en algunes ocasions s'observa una recaiguda de la malaltia, bé a nivell local o a distància, sent un dels reptes actuals la identificació i detecció de la malaltia mínima residual. La seva identificació mitjançant l'estratègia de dosificar les concentracions de DNA tumoral circulant (ctDNA) poden permetre identificar als pacients amb més risc de rebrot o que inclús es poden beneficiar d'estratègies terapèutiques diferents delimitades per aquests tipus de marcador³.

En la malaltia disseminada, tot i que sovint es pot assolir una resposta al tractament sistèmic, sovint es desenvolupen resistències al tractament general produint la progressió de la malaltia i condicionant l'expectativa de vida dels malalts, requerint avaluar la

possibilitat de benefici d'un tractament de segona o fins i tot de tercera línia.

La immunoteràpia ha estat reconeguda com una quarta estratègia pel tractament del càncer i consisteix en potenciar el reconeixement antigènic del sistema immune del individu en front de les cèl·lules tumorals amb les quals usualment tenen una tolerància. De fet, les cèl·lules tumorals eviten ser reconegudes per part dels limfòcits T. No obstant, la possibilitat de poder emprar anticossos adreçats a determinats epítops de les cèl·lules tumorals o bé que trenquin l'equilibri de tolerància entre les cèl·lules tumorals i el sistema immunitari, o bé la seva activació mitjançant estratègies de modificació de determinats clons de limfòcits T ha permès assolir uns resultats terapèutics que fins ara no s'havien observat en situacions de malaltia avançada.

Es poden distingir quatre estratègies: 1) anticossos dirigits a dianes moleculars; 2) immunomoduladors; 3) vacunes; 4) teràpia adoptiva cel·lular.

Un dels eixos en els que es va començar a fonamentar la immunoteràpia fou amb el

desenvolupament d'anticossos monoclonals adreçats a dominis específics de determinades cèl·lules. La primera experiència fou amb rituximab, un anticòs monoclonal anti-CD-20, assolint un efecte sorprenent en pacients afectes d'un limfoma no Hodgkin avançat combinat amb quimioteràpia⁴. Al cap de poc temps es va sintetitzar l'anticòs trastuzumab adreçat contra el domini IV de la part extracel·lular del receptor HER2. Aquest anticòs impedia el procés d'homo o heterodimerització del receptor i, en associar-lo a quimioteràpia, presentava un efecte sinèrgic molt notable. Al mateix temps l'ancoratge de l'anticòs al receptor de membrana permetia que les cèl·lules fossin reconegudes pel propi sistema immunitari i fossin també destruïdes^{5,6}. El primer estudi pivotal va comparar l'administració de quimioteràpia combinada amb l'anticòs respecte a l'administració de quimioteràpia sola en pacients amb tumors amb l'amplificació del HER2 i va permetre observar un increment del índex de resposta així com també una duplicació del temps lliure de progressió⁶. Més tard, l'addició de trastuzumab a la quimioteràpia primària sistèmica va mostrar un increment del nombre de casos que assolien una remissió

completa patològica tant local com axil·lar, així com també en el tractament complementari després del tractament quirúrgic. El fet d'afegir aquest anticòs combinat o no amb quimioteràpia permetia reduir el risc de recaiguda per la malaltia en quasi un 50%. Més tard es va identificar un segon anticòs, el pertuzumab, que s'ancorava en el domini II de la part extracel·lular del receptor, impeding que aquest s'acoblés amb un altre de la seva família. La combinació de trastuzumab i pertuzumab amb quimioteràpia va permetre observar un efecte molt més potent del bloqueig tant en la malaltia avançada⁷ com en el tractament neoadjuvant⁸. No obstant, en el context del tractament complementari, l'estudi Aphinity, que va comparar l'administració dels dos anticossos respecte a trastuzumab sol, va mostrar una diferència estadísticament significativa de la combinació però amb un impacte clínic baix⁹. En altres neoplàsies, com és el càncer de còlon avançat, la combinació d'anticossos monoclonals dirigits contra el receptor del factor de creixement epidèrmic, com són el cetuximab i el panitumumab, varen mostrar un efecte sinèrgic en ser combinats

amb quimioteràpia de primera i segona línia, sempre i quan no es detectessin mutacions en altres gens com *k-ras* o *n-ras*, que no s'associaven a aquest efecte sinèrgic^{10,11}. Totes aquestes troballes foren fetes fa anys gràcies al desenvolupament de diferents estudis clínics que tenien per objectiu demostrar l'existència d'aquests efectes i varen permetre que posteriorment aquests anticossos fossin incorporats en la pràctica assistencial. Fins al moment actual, més de 30 anticossos monoclonals es poden emprar combinats amb altres agents citostàtics per tractar el càncer.

Fa uns quants anys es varen desenvolupar anticossos monoclonals dirigits a una diana terapèutica combinats a un citostàtic (anticossos conjugats). Aquest plantejament permet que els citostàtics arribin a les cèl·lules tumorals a les quals es fixa l'anticòs. Un d'aquests fàrmacs és el TDM-1, que en tumors HER2 positius va mostrar un benefici clar en el tractament de segona línia dels tumors disseminats¹². Un altre fàrmac és el sacituzumab govitecan, que es un anticòs anti-Trop2 que porta ancorades varies molècules de irinotecan i ha demostrat un efecte clar en el tractament del càncer de mama avançat de tipus triple negatiu¹³. De forma molt recent, el trastuzumab deruxtecan, que és un

anticòs conjugat anti-HER2, ha demostrat tenir un efecte molt notable en el tractament de la malaltia disseminada prèviament tractada¹⁴. Adcetris® és una combinació de bentruximab que està adreçat a les cèl·lules CD30 i auristatina E, i que va mostrar tenir activitat en el tractament del limfoma de Hodgkin¹⁵.

És coneguda la manca de resposta del sistema immunitari del propi individu quan es genera un tumor. Un dels mecanismes és evitar l'activació dels limfòcits T en el procés de presentació antigènica, bé perquè el tumor produeix mutacions del gen del sistema major de histocompatibilitat, o bé per produir-se un bloqueig d'aquells receptors que indueixen la mort cel·lular programada (PD-L1 en la cèl·lula tumoral i el PD-1 en els limfòcits). Per últim, el propi microambient tumoral pot induir un estat de supressió de la resposta immunològica mitjançant la producció de determinades citocines, com son el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), les interleucines i el TGF (*transforming growth factor-beta*). Aquestes molècules estan sintetitzades tant per part de les cèl·lules tumorals com les del sistema immunitari.

Una estratègia per millorar la presentació antigènica als limfòcits T és l'administració de citocines amb acció immunomoduladora.

Les primeres foren el interferó alfa-2b, produït amb tecnologia de DNA recombinant, que varen demostrar una certa activitat antitumoral en algunes leucèmies, limfomes i melanoma¹⁶. Més tard, la interleucina-2, també produïda amb un sistema similar, va demostrar induir un cert grau de regressions tumorals en pacients afectats de tumors renals i melanoma¹⁷. Més tard, es varen sintetitzar diferents anticossos adreçats a proteïnes que inhibeixen la resposta immunològica, tant en les cèl·lules tumorals com en els propis limfòcits. El primer anticòs fou ipilimumab, un anticòs dirigit contra CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*) que s'expressa en els limfòcits. Aquest anticòs va mostrar una activitat notable en pacients afectes de melanoma disseminat¹⁸. Atezolizumab és un anticòs adreçat contra PD-L1 de les cèl·lules tumorals i ha mostrat una activitat en càncer de pulmó i càncer urotelial¹⁹. Nivolumab és un anticòs contra PD-1, un receptor existent en els limfòcits T, demostrant activitat antitumoral en càncer de pulmó disseminat²⁰. Per altre banda, pembrolizumab, un altre anticòs anti-PD-1, va demostrar en un estudi fase III una gran activitat en pacients afectes de càncer de pulmó disseminat quan les seves cèl·lules tumorals expressaven una alta expressió de PD-L1 (per sobre del 50%)²¹. Amb el temps, es va constatar

que es podia millorar la resposta immunològica quan aquests anticossos es combinaven entre si, o be quan es combinaven amb quimioteràpia o be radioteràpia. D'aquesta manera, diferents estudis varen mostrar un increment significatiu del temps lliure de progressió tant en càncer de pulmó com en melanoma, sent a dia d'avui l'estratègia que s'empra en un gran nombre de neoplàsies avançades.

No obstant, malgrat els bons resultats inicials, s'observa que sols un 15% dels casos presenten respostes de llarga durada, i malgrat assolir uns temps de progressió millors que fa uns anys, no en tots els estudis s'han pogut identificar increments significatius de la supervivència²². Els motius d'aquestes observacions poden ser explicats, d'una banda, per la diferència de criteris en la selecció de pacients, en especial per les divergències existents en l'avaluació de marcadors predictius de resposta, en aquest cas l'expressió de PD-L1 en que segons l'anticòs emprat els índexs de resposta poden ser diferents²³, també per aparició de resistències motivades per l'efecte del microambient tumoral, o bé per l'heterogeneïtat de la població tumoral. La identificació dels mecanismes de resistència representen a dia d'avui un dels reptes per a poder assolir uns millors resultats terapèutics en la malaltia avançada.

No podem passar per alt que l'administració de tots aquests anticossos no estan exempts de riscos de toxicitat. Molts dels efectes secundaris estan en relació amb l'efecte de la resposta d'estimulació limfocitària que indueixen reaccions immunomediades en diferents òrgans del nostre cos. Entre elles cal destacar les pneumonitis, les colitis, l'afectació de la funció de la glàndula tiroides o be la hipòfisi. Alguns d'aquestes efectes adversos poden ser greus si no son identificats amb una certa prestesa i ha obligat a disposar en les institucions d'equips multidisciplinaris que actuïn de manera sincronitzada amb l'objectiu de millorar l'estat del pacient.

Les vacunes també han estat un eix a destacar en el desenvolupament de la immunoteràpia, en potenciar el sistema immunitari i en injectar antígens específics expressats en la superfície de les cèl·lules tumorals. Les vacunes han tingut un llarg recorregut en la prevenció de càncer com en el cas de la vacuna contra determinats tipus de virus del papil·loma i el càncer de cèrvix, o bé en el cas de la vacuna contra el virus de l'hepatitis B i l'hepatocarcinoma. Al mateix temps, en el tractament del càncer han existit altres estratègies, com és el cas del desenvolupament de vacunes de cèl·lules dendrítiques, sipuleucel-T, que ha mostrat activitat en el tractament del càncer de pròstata avançat refractari a teràpia

endocrina²⁴. També ha existit el desenvolupament d'altres estratègies semblants en melanoma disseminat.

La possibilitat de poder recol·lectar limfòcits T de la sang perifèrica dels propis pacients, poder induir modificacions genètiques en els mateixos, fer-los créixer en cultiu i re-infondre'ls de nou en el mateix pacient, ha representat un avenç molt important en els darrers anys. En efecte, els CAR-T cells permeten obtenir limfòcits T que reconeixin les cèl·lules tumorals sense haver de dependre del sistema HLA. Aquest tipus de teràpia ha demostrat obtenir uns excel·lents resultats en el tractament de limfomes refractaris o en leucèmia limfoblàstica aguda refractària a quimioteràpia. A dia d'avui s'estan iniciant aquest tipus d'estratègies en el tractament del mieloma i altres tumors sòlids. Tot i els grans resultats assolits i demostrats en molts estudis, l'administració d'aquesta teràpia està associada a toxicitat motivada per la gran cascada de citocines produïdes per l'enfrontament dels limfòcits modificats a les cèl·lules tumorals persistents^{25,26}, que obliga a una monitorització estreta dels pacients tractats.

A mode de conclusions, la immunoteràpia ha demostrat ser una estratègia terapèutica que ha canviat el curs evolutiu de moltes neoplàsies avançades. No obstant, encara

existeixen moltes preguntes pendents de ser resoltes, com és la necessitat de identificar els pacients que tenen un millor benefici. Alhora està pendent de definir la durada optima dels tractaments dirigits, la identificació de les resistències a la teràpia i la seva possible modificació. El desenvolupament de vacunes adreçades a determinats antígens obre un camí per estimular el sistema

immunològic del propi pacient envers la seva neoplàsia. La teràpia cel·lular adoptiva ha mostrat ser una alternativa de present i de futur que permet visualitzar un gran camí en el tractament de moltes neoplàsies, si bé el repte actual és millorar el procés d'obtenció dels limfòcits modificats i minimitzar l'impacte dels efectes secundaris per fer que la seva utilització sigui més assolible. No obstant, és necessari

continuar realitzant nous estudis per consolidar aquestes estratègies en benefici dels pacients que haurem d'atendre i tractar en el futur.

Per últim, només em resta felicitar a la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya i a la seva Junta Directiva per a celebrar els 250 anys de la seva fundació. Per molts anys i enhorabona per l'organització dels actes de la seva celebració.

Referències

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:7-33.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
3. Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR, Weinstock DM. Targeting minima residual disease: a path to cure? *Nat Rev Cancer.* 2018;18:255-63.
4. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346:235-42.
5. Hudis C. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357:39-51.
6. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344:783-92.
7. Baselga J, Cortes J, Kim SB, et al. Pertuzumab and trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:109-19.
8. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomized multicenter, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:25-32.
9. Von Minckvisk G, Procter M, de Azambuja E, et al. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2017;377:122-31.
10. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33:692-700.

11. Seligmann JF, Elliott F, Richman S, et al. Clinical and molecular characteristics and treatment outcomes of advanced right-colon, left-colon and rectal cancers: data from 1180 patients in a phase III trial of panitumumab with an extended biomarker panel. *Ann Oncol.* 2020;31:1021-9.
12. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;367:1783-91.
13. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, et al. Sacituzumab govitecan in metastatic triple negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2021;384:1529-41.
14. Cortes J, Kim SB, Chung WP, et al. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine for breast cancer. *N Engl J Med.* 2022;386:1143-54.
15. Granavis I, Tzoganis K, Van Hennik P, et al. The European Medicines Agency review of bentuximab (Adcetris) for the treatment of adult patients with relapsed or refractory CD30+ Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma: summary of the scientific assessment of the committee for medical products for human use. *Oncologist.* 2015;21:102-9.
16. Han S, Hunag K, Gu Z, Wu J. Tumor microenvironment modulation-based drug delivery strategies for cancer immunotherapy. *Nanoscale.* 2020;12:412-36.
17. Quijano-Rubio A, Ulge UY, Walkey CD, Silva DA. The advent of the novo proteins for cancer immunotherapy. *Curr Opin Chem Biol.* 2020;56:119-26.
18. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33:1889-94.
19. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;389:255-65.
20. Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, et al. Five-year outcomes from randomized phase III trials Checkmate 017 and 057: nivolumab versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2021;39:723-33.
21. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:1823-33.
22. Peters S, Reck M, Smitt EE, Mok T, Hellmann MD. How to make the best use of immunotherapy as first-line treatment of advanced metastatic non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2019;30:884-96.
23. Rugo HS, Loi S, Adams S, et al. PD-L1 immunohistochemistry assay comparison in atezolizumab plus nab-paclitaxel-treated advanced triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2021;117:1733-42.
24. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:411-22.
25. Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378:449-59.
26. Roschewski M, Longo DL, Wilson WH. CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma – who, when and how? *N Engl J Med.* 2022;386:692-6.

Teràpia gènica: per fi una opció en clínica

Fàtima Bosch

La teràpia gènica consisteix en la transferència de material genètic a cèl·lules o teixits per prevenir o curar una malaltia. En aquest moment, és sens dubte l'àrea més emocionant de la biomedicina, tant pels avenços recents com per les possibilitats a l'horitzó. En els darrers anys, s'han desenvolupat nombroses teràpies gèniques d'èxit centrades en malalties monogèniques minoritàries (també anomenades malalties rares). A mesura que la teràpia gènica arriba finalment a l'edat madura, els coneixements adquirits en aquests primers tractaments representen un enorme potencial per ampliar el camp i aplicar la teràpia gènica a malalties complexes, no hereditàries i d'alta prevalença que afecten grans poblacions de pacients.

Les malalties genètiques minoritàries no es poden curar mitjançant les teràpies que utilitzen medicaments convencionals. En principi, amb la restauració d'una còpia correcta del gen mutat, la teràpia gènica permetria que molts pacients sense cap esperança de millora poguessin tenir una vida llarga i en condicions

de normalitat. Després de superar molts dels reptes que van dificultar l'èxit de la teràpia gènica en els seus primers anys, la tecnologia de transferència genètica s'ha començat a utilitzar amb èxit per tractar diferents tipus de càncer i també malalties cardiovasculars, l'Alzheimer o la diabetis mellitus.

En aquest sentit, s'ha de ressaltar l'enorme potencial que ha demostrat la teràpia gènica per prevenir la gran pandèmia de COVID-19 a nivell global. Actualment, la majoria de la població mundial ha rebut les vacunes basades en gens transferits mitjançant adenovirus (AstraZeneca, Jansen) o en àcid ribonucleic (RNA) terapèutic en nanopartícules (Moderna, BioNTech-Pfizer) que permeten expressar una de les proteïnes virals per així poder desenvolupar immunitat contra el virus. Aquest ha estat un èxit extraordinari pel camp de la teràpia gènica que ha obert les portes a nombrosos desenvolupaments futurs en moltes altres àrees, no només per combatre malalties infeccioses.

Principals característiques de la teràpia gènica

Es poden distingir dos grans tipus d'aproximacions de teràpia gènica: 1) *in vivo*, basada en la introducció d'un gen/RNA terapèutic en un vector (viral o no viral) que s'administra directament al pacient, i 2) *ex vivo*, basada en la transferència del vector que porta el gen terapèutic a cèl·lules en cultiu, generalment obtingudes del mateix pacient, que posteriorment es re-introdueixen i produeixen la proteïna terapèutica (Fig. 1).

En el nostre grup ens hem centrat a desenvolupar teràpies gèniques *in vivo* tant per malalties minoritàries com d'alta prevalença. Per això, presentaré els aspectes claus d'aquest camp i uns exemples de les nostres recerques que ja estan avançant cap a la clínica.

Per tal de dissenyar una nova aproximació de teràpia gènica *in vivo*, s'ha de seleccionar en primer lloc el gen o el RNA terapèutic per tractar/prevenir la malaltia. Després, aquest àcid nucleic ha de ser transportat

mitjançant un vehicle o vector fins a la cèl·lula diana que serà l'encarregada d'expressar la proteïna terapèutica. Un aspecte clau per assolir la transferència del gen terapèutic a la cèl·lula diana, és la via d'administració mitjançant la qual el vector s'introdueix al pacient per tal d'arribar a la seva destinació. Finalment, cal disposar de models animals de les malalties humanes que s'han de tractar, en els quals es pugui assajar l'eficàcia i la seguretat de l'aproximació de teràpia gènica (Fig. 2). Els models animals més

Figura 1. Representació esquemàtica de les teràpies gèniques in vivo i ex vivo.

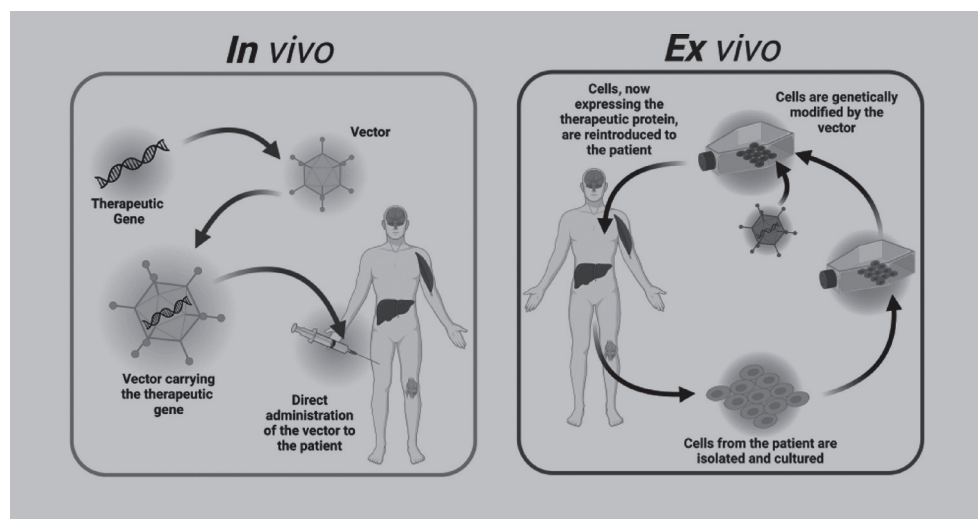
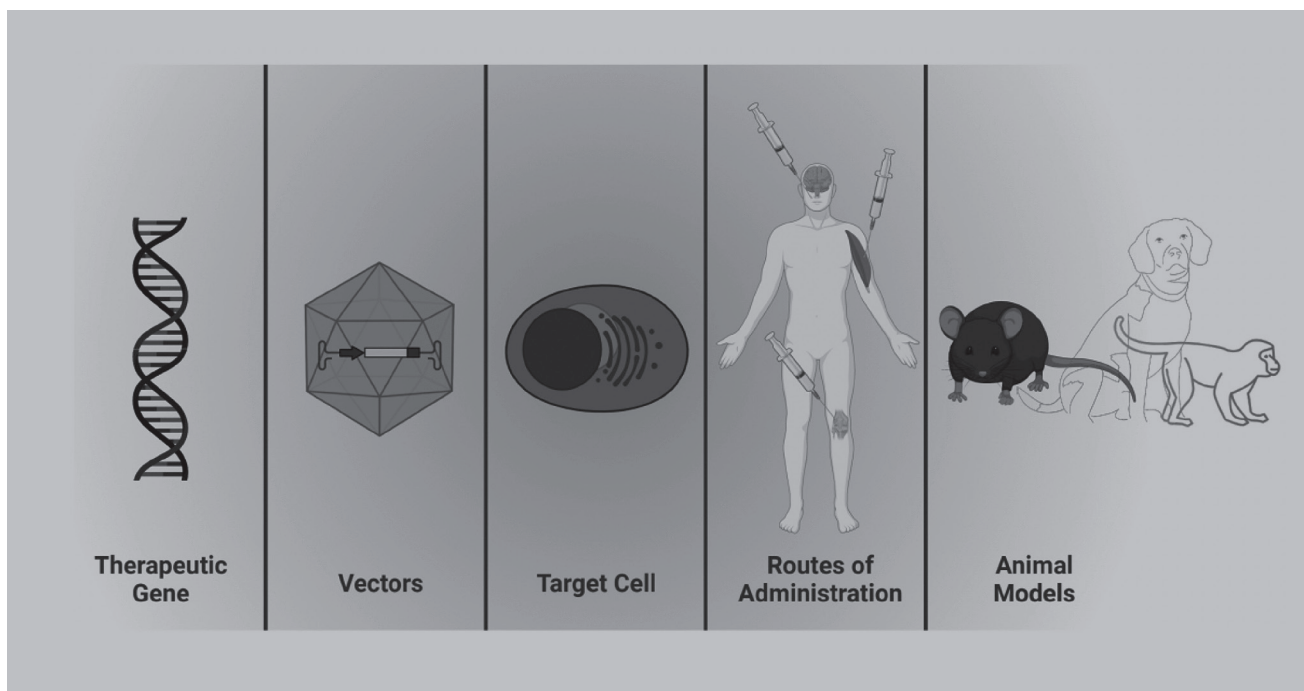


Figura 2. Aspectes clau que cal tenir en compte al dissenyar una estratègia de teràpia gènica in vivo. En primer lloc, s'ha d'escollir el gen terapèutic que es transferirà, que dependrà de la malaltia, i, a continuació, el vector que transportarà aquest gen d'interès a un teixit diana. Així mateix, serà molt important la via d'administració seleccionada (intravenosa, intramuscular, intralíquid cefalorraquidi, etc.) per arribar al teixit o cèl·lules diana d'una manera eficient. Finalment, és clau poder disposar d'un model animal de la malaltia en el qual assajar les noves estratègies de teràpia gènica.



emprats són ratolins manipulats genèticament perquè siguin deficitaris per al gen causant d'una malaltia genètica (ratolins *knock-out* o *knock-in*). En fases avançades dels estudis preclínic, abans d'arribar a la clínica amb pacients humans, s'assagen les estratègies terapèutiques en models animals grans, com, per exemple, primats no humans o gossos.

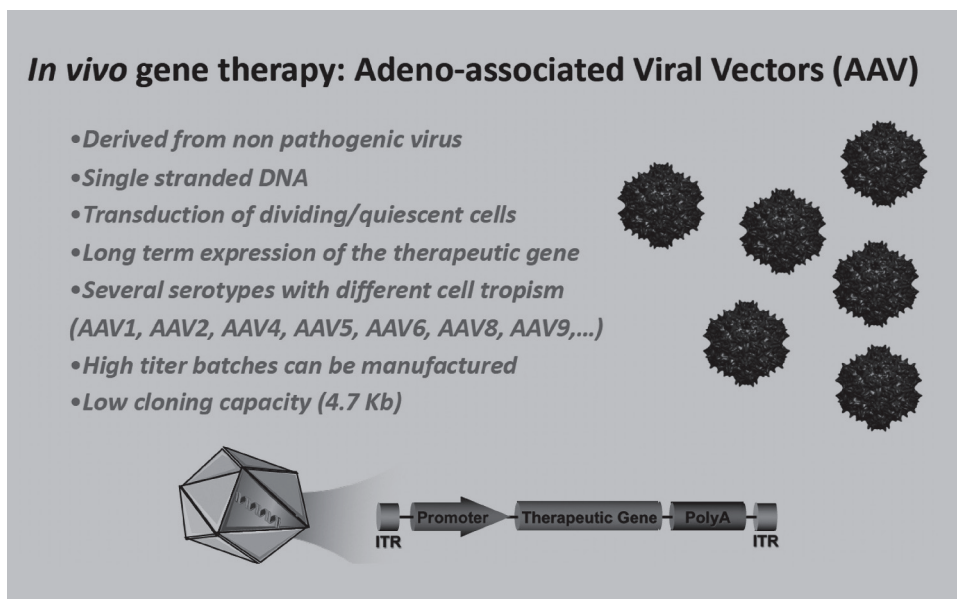
En els darrers anys, s'han desenvolupat un gran nombre de vectors per transportar el gen terapèutic. L'elecció d'un vector o un altre depèn de factors com el teixit

diana que es manipularà o el tipus de tractament –crònic o a curt termini– que pot requerir la malaltia. Segons l'origen dels vectors, es poden distingir dos grans grups: vectors virals i vectors no virals.

Els vectors virals deriven de virus. Els virus són altament eficients en la transferència del seu material genètic a les cèl·lules hoste. La teràpia gènica aprofita aquesta característica i els gens virals són substituïts pel gen terapèutic, de manera que el virus esdevé un vector viral. Entre els diferents vectors virals que s'han utilitzat per introduir gens d'interès a

les cèl·lules, els vectors virals adenoassociats (AAV) són els més emprats en les aproximacions de teràpia gènica *in vivo*¹). Aquests vectors AAV deriven de virus que no causen malalties ni en animals ni en humans i, per tant, es consideren vectors molt segurs. El genoma dels virus adenoassociats està format per DNA de cadena senzilla. Després d'entrar a la cèl·lula per endocitosi, la partícula viral allibera la molècula de DNA al nucli cel·lular, on es converteix en una molècula de DNA de cadena doble, que persisteix com a DNA episòmic en el nucli de les cèl·lules que no es divideixen. Aquests vectors AAV són capaços de produir alts nivells de proteïna terapèutica a la cèl·lula diana, i aquesta expressió es pot mantenir a molt llarg termini (anys) en teixits amb una taxa de divisió cel·lular baixa, com el fetge en adults, el múscul esquelètic o el cervell. S'han descrit diversos serotips d'AAV que mostren variacions en el seu tropisme per a diferents cèl·lules i teixits. La principal limitació d'aquests vectors és la seva mida petita, ja que només poden empaquetar un gen terapèutic de fins a 4,5 kb (Fig. 3). Els vectors AAV presenten també excel·lents perfils de seguretat en estudis clínics, pel fet de tenir una baixa toxicitat i immunogenicitat, que permet l'expressió a llarg termini del gen terapèutic¹.

Figura 3. Característiques principals dels vectors adenoassociats (AAV). A la part inferior es mostra de manera esquemàtica la composició bàsica del genoma d'un vector AAV, on el gen terapèutic està sota el control d'un promotor específic que es troba entre les dues seqüències ITR (inverted terminal repeats) del virus.



Teràpia gènica per al tractament de les malalties minoritàries

Les malalties rares suposen un important problema de salut pública, ja que la majoria d'elles són molt discapacitants, disminueixen l'esperança de vida i redueixen dràsticament la qualitat de vida dels pacients. Moltes causen la mort dels pacients a edats molt primerenques. A la Unió Europea hi ha més de trenta milions d'individus afectats per una de les més de sis mil malalties rares descrites fins ara. Actualment, hi ha un nombre molt limitat de medicaments orfes comercialitzats, i la gran majoria d'aquestes malalties no tenen cap tractament eficaç.

La major part de les malalties rares són hereditàries i, per tant, la transferència gènica de la seqüència codificadora correcta de la proteïna alterada als teixits afectats seria per si mateixa curativa. La teràpia gènica in vivo mitjançada per vectors AAV ofereix la possibilitat d'un tractament puntual, amb la possibilitat d'efectes beneficiosos per a tota la vida. Nombroses «proves de concepte» en models animals i en pacients humans demostren l'eficaç transferència de gens mitjançant vectors AAV a diversos òrgans com el cervell, el fetge, el múscul esquelètic, l'ull o el cor pel tractament de gran nombre de malalties.

Tot i els resultats prometedors que sorgeixen dels assajos clínics de productes de teràpia gènica, el repte continua sent enorme, ja que les malalties hereditàries rares es compten a milers i totes juntes representen un cost social i econòmic immens, així com una gran necessitat mèdica. Actualment, ja han obtingut l'aprovació per a ser comercialitzades, per part dels organismes reguladors d'Europa (Agència Europea del Medicament, EMA) o dels Estats Units (Food and Drug Administration, FDA), cinc aproximacions de teràpia gènica per a malalties hereditàries que es basen en vectors AAV.

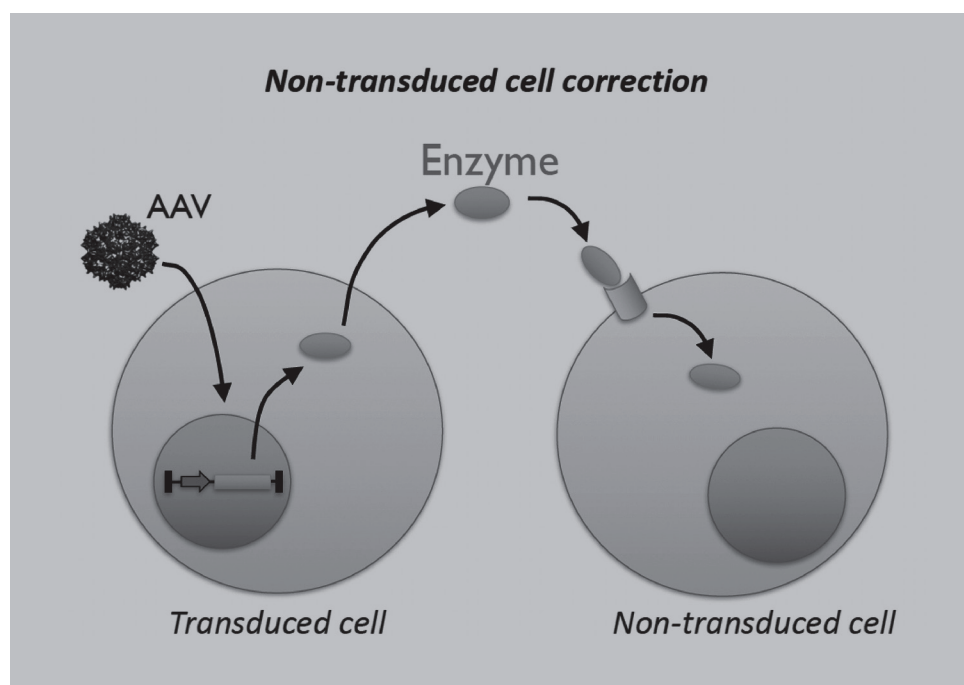
Malalties minoritàries d'emmagatzematge lisosòmic

Les malalties d'emmagatzematge lisosòmic (LSD, *lysosomal storage disorders*) són un grup d'aproximadament cinquanta malalties rares que tenen com a resultat alteracions de la funció dels lisosomes². Els lisosomes són orgànuls cel·lulars que presenten un lumen àcid (pH de 4,5-5,0) i que digereixen proteïnes, àcids nucleics, hidrats de carboni i alguns lípids, ja que contenen una gran quantitat d'hidrolases àcides. Aquestes alteracions dels lisosomes són causades per defectes genètics en gens que codifiquen per enzims lisosòmics, els seus cofactors o per proteïnes que participen en el

transport de proteïnes al lisosoma. Molècules parcialment digerides o substrats sencers s'acumulen progressivament a l'interior d'aquests orgànuls, provocant la seva distensió i un dany cel·lular progressiu que finalment dona lloc a la mort cel·lular³. La majoria dels pacients amb LSD neixen aparentment sans i els símptomes es presenten d'una manera progressiva. La velocitat i la severitat d'aparició dels símptomes depenen de factors com el substrat que s'acumula, el tipus cel·lular en què es produeix aquest dipòsit o la mutació genètica causant de la malaltia.

El tipus de substrat que s'acumula (mucopolisacàrids, esfingolípid, glicogen, colesterol, etc.) s'utilitza per a classificar els diferents tipus de LSD³. A més, algunes de les LSD es classifiquen en subtipus en funció sobretot del gen mutat encarregat de la degradació seqüencial d'un mateix substrat. Per a la majoria de malalties d'emmagatzematge lisosòmic no hi ha cura. La teràpia gènica in vivo és una eina atractiva per al tractament de les LSD causades per deficiències d'enzims lisosòmics que són secretables⁴. Això és així perquè, d'una banda, no és necessària la restauració completa de l'activitat enzimàtica normal d'una cèl·lula, ja que s'ha observat que la restauració d'un 10-20 % de l'activitat enzimàtica

Figura 4. Teràpia gènica in vivo per a LSD. Es basa en el principi de correcció encreuada per aconseguir corregir la manca d'activitat enzimàtica de totes les cèl·lules d'un òrgan afectat. Gràcies a la distribució pels fluids corporals (sang, líquid cefalorraquidi, etc.) dels enzims secretats per les cèl·lules manipulades genèticament (transduïdes pel vector AAV), es pot arribar a obtenir una correcció de tot l'organisme d'un pacient.



ja pot revertir les alteracions patològiques. A més, a diferència d'altres malalties minoritàries, en les LSD no es requereix la transducció de totes les cèl·lules de l'òrgan afectat. Aquestes estratègies de teràpia gènica es basen en la correcció encreuada: un enzim lisosòmic soluble present al compartiment extracel·lular produït i secretat per una cèl·lula que ha estat modificada genèticament per un AAV pot ser captat per endocitosis quan s'uneix als

receptors de mannanosa-6P presents a la membrana plasmàtica i permet la correcció d'altres cèl·lules que no han estat transduïdes (cèl·lules veïnes, altres cèl·lules de l'òrgan diana o, fins i tot, d'altres òrgans del cos, en el cas que l'enzim arribi als fluids principals, com el sèrum i el líquid cefalorraquidi [LCR])⁵ (Fig. 4).

En el nostre grup ens hem centrat sobretot en el desenvolupament de teràpies gèniques per al tractament per a quatre LSD neurodegeneratives

molt severes, les mucopolisacàridosis de tipus II (MPSII) (síndrome de Hunter), tipus III (MPSIIIA, IIIB, IIIC o IIID; síndrome de Sanfilippo A, B, C o D) i per a una LSD que afecta el sistema esquelètic, la de tipus IV (MPSIVA; malaltia de Morquio A). Aquestes malalties resulten de deficiències enzimàtiques que causen l'acumulació intracel·lular de glicosaminoglicans (GAG) parcialment degradats.

Aquest projecte es va iniciar gràcies a la interacció amb l'Associació Espanyola de famílies afectades de MPS (MPS España; <https://www.mpssp.org/>). La nostra relació amb les famílies ens ha inspirat i motivat a treballar molt activament per tal de trobar una solució per a aquestes malalties tan greus.

Teràpia gènica per a les mucopolisacàridosis

La MPSIII és el tipus més freqüent de MPS, sobretot a Europa, amb una herència autosòmica recessiva⁶. La síndrome de Sanfilippo es classifica en quatre subtipus segons l'enzim deficient implicat en la degradació del GAG heparan sulfat (HS): la deficiència en N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa o sulfamidasa (SGSH) provoca el tipus IIIA; en α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), el tipus IIIB; en acetil-CoA α -glucosaminidasa-acetiltransferasa (HGSNAT), el tipus IIIC, i en N-acetilglucosamina-6-sulfatasa

(GNS), el tipus IIID. Els quatre subtipus comparteixen mecanismes fisiopatològics comuns, així com signes clínics i un pronòstic similars. La MPSIII es caracteritza per ser una malaltia neurodegenerativa greu i progressiva però amb una afectació somàtica lleu. La malaltia progressa amb l'edat i provoca la mort dels pacients, durant la seva segona dècada de vida^{6,7}.

La MPSII és una LSD recessiva lligada al cromosoma X que afecta només els nens, causada per la deficiència d'iduronat-2-sulfatasa⁸. Aquest enzim lisosòmic és essencial per a la degradació conjunta dels GAG HS i dermatan sulfat. Es tracta també d'un altre tipus molt comú de MPS, i és la més freqüent a l'Àsia^{9,10}.

La MPSII és un trastorn variable, progressiu i multisistèmic, amb un deteriorament neurològic sever que també implica l'obstrucció de les vies respiratòries, deformitats esquelètiques i cardiomiopatia.

El sistema nerviós central (SNC), l'òrgan més afectat en les MPSII i MPSIII, està aïllat anatòmicament de la resta del cos per la barrera hematoencefàlica. Aquest fet fa que aconseguir un grau suficient de correcció gènica d'aquest òrgan sigui més complicat.

En el nostre grup hem desenvolupat per a aquests trastorns neurodegeneratius aproximacions de teràpia gènica que es basen en

l'administració local al cervell de vectors AAV mitjançant la injecció directa al líquid cefalorraquidi (intra-LCR) que banya tot el SNC (Fig. 5). Així, vam demostrar que l'administració de vectors AAV9 directament al LCR a través de la cisterna magna, un gran espai subaracnoidal ple de LCR, facilita la distribució dels vectors a tot el SNC. D'aquesta manera, amb una dosi de vectors AAV molt baixa, s'aconsegueix la transducció generalitzada del SNC, des de les parts més rostrals a les més caudals de l'encèfal i per tota la medulla espinal. A més, els vectors penetren des de la superfície fins a zones més profundes del SNC. Posteriorment, les cèl·lules transduïdes secreten

també les proteïnes al LCR, augmentant l'eficàcia gràcies a la distribució de la proteïna terapèutica per tot el SNC.

També vam observar que després de l'administració intra-LCR una part del vector AAV9 passa del LCR a la circulació sanguínia i transdueix molt eficientment el fetge que expressa llavors el gen terapèutic i secreta la proteïna terapèutica que pot ser captada de la sang i corregeix així la resta d'òrgans somàtics (el cor, els pulmons, els ronyons, etc.) gràcies al principi de correcció encreuada.

El nostre grup va ser el primer a demostrar, mitjançant aquesta estratègia de teràpia gènica, la correcció completa de la MPSIII en

Figura 5. Administració dels vectors AAV directament al líquid cefalorraquidi (intra-LCR). El LCR banya el SNC i s'hi pot accedir a través de la cisterna magna o del ventricle lateral. L'administració dels vectors AAV al LCR permet transduir eficientment tot el SNC.

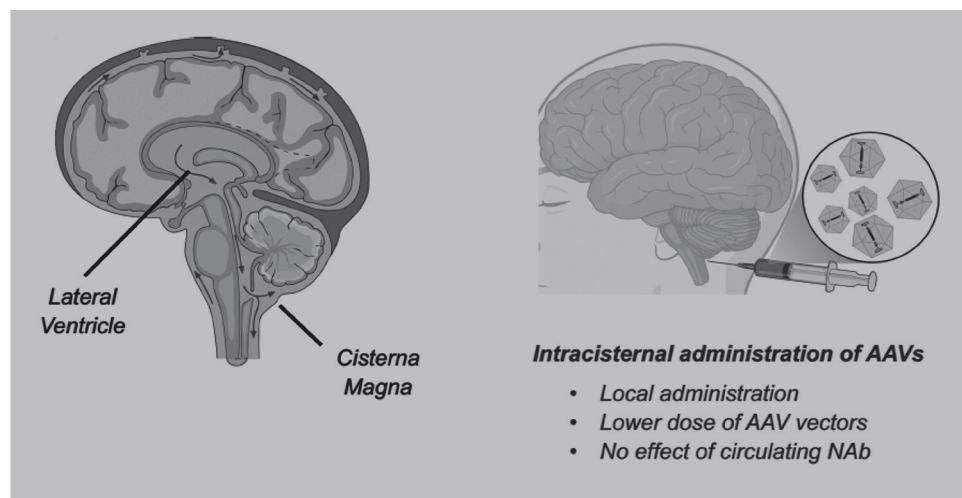
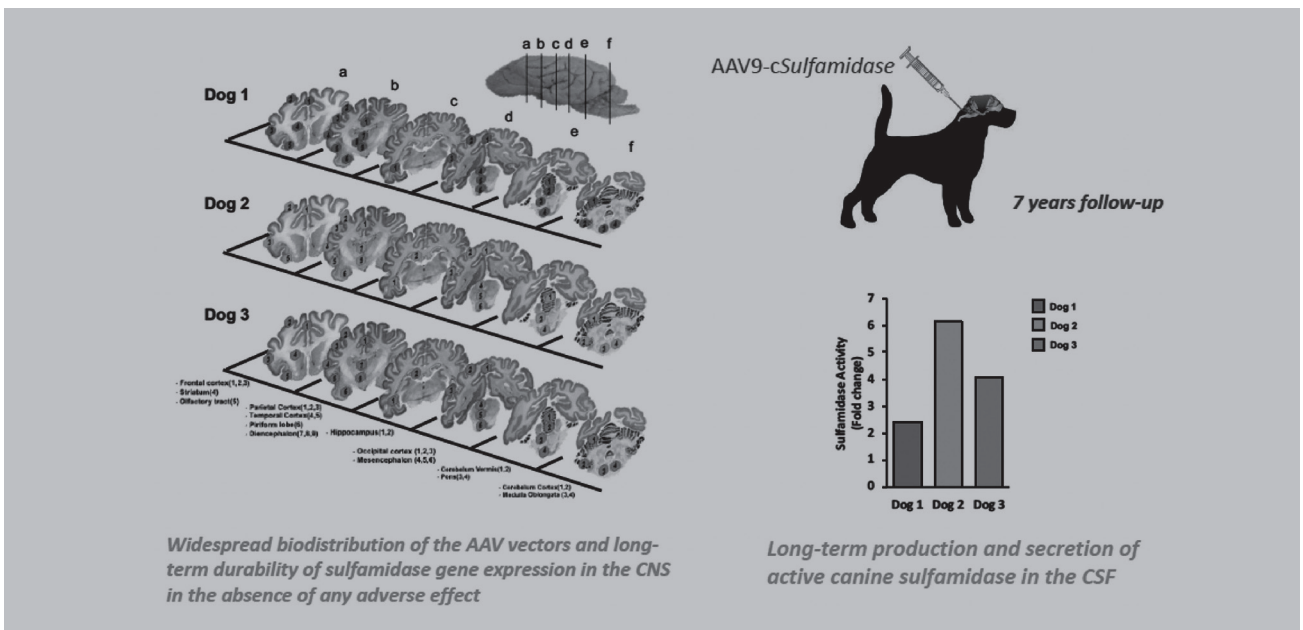


Figura 6. Expressió i activitat sulfamidasa a llarg termini al SNC després de la transferència gènica mitjançada per vectors AAV9 al LCR de gossos. Tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat de sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una administració del vector AAV. A més, presentaven nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal set anys després del tractament.



un model animal de la malaltia amb afectació neurològica greu. L'administració intra-CSF de vectors AAV9 que codificaven per al gen de la sulfamidasa aconseguia nivells d'activitat més elevats de la proteïna terapèutica que el que s'assolia en estudis previs en els quals utilitzàvem l'administració sistèmica del vector¹¹⁻¹³. En aquests ratolins MPSIIIA tractats intra-LCR amb l'AAV9-sulfamidasa es va observar l'eliminació dels GAG acumulats, la resolució de la patologia lisosòmica i de la neuroinflamació al

cervell i la correcció dels dèficits conductuals¹¹. També es va obtenir un increment de l'activitat enzimàtica al sèrum, amb el fetge com la font de l'enzim circulant, que va permetre revertir la patologia lisosòmica a tots els òrgans perifèrics¹¹. En conjunt, el tractament amb AAV9-sulfamidasa va resultar en la prolongació de la supervivència dels animals tractats. Així, el nostre estudi va ser el primer a demostrar la correcció a nivell de tot l'organisme d'una malaltia d'emmagatzematge lisosòmic després del tractament amb una

teràpia gènica. També vam demostrar que aquesta aproximació era eficaç per al tractament d'altres MPS, tant la MPSIIIB com la MPSIIID, així com la MPSII¹⁴⁻¹⁶.

Una vegada demostrats els resultats positius en ratolins model de MPS, també hem demostrat que l'administració intra-LCR de vectors AAV9-sulfamidasa és factible i segura en models animals grans, com els gossos Beagle, en els quals hem observat la producció i secreció de la proteïna terapèutica durant molts anys (>7 anys) després d'una sola

administració de vector a través de la cisterna magna. Aquestes observacions constitueixen el seguiment a més llarg termini d'un model animal gran després de l'administració dels vectors AAV al LCR.

Els gossos injectats van tolerar molt bé el tractament i no van desenvolupar cap signe clínic que suggerís efectes nocius associats a la presència del vector o a l'expressió contínua del transgèn al cervell o a la medul·la espinal al llarg de tots aquests anys. El més important és que tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una sola administració del vector AAV. A més, vam detectar uns nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim, en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal (Fig. 6). Tots aquests resultats indiquen també l'excel·lent perfil de seguretat a llarg termini d'aquesta teràpia en animals grans.

Amb aquestes aproximacions per les MPS hem pogut demostrar que l'administració del vector terapèutic podia provocar un augment de l'activitat enzimàtica a tot l'encèfal, el fetge i el sèrum, que al seu torn va resultar en: 1) la correcció dels GAG acumulats al SNC i als teixits i els òrgans perifèrics, 2) la resolució de la patologia lisosòmica i la

neuroinflamació al SNC, 3) la correcció dels dèficits de comportament, i 4) la prolongació de la supervivència a llarg termini. Aquests estudis han permès l'establiment d'una Plataforma per al tractament de malalties minoritàries que presenten neurodegeneració, centrada en l'administració al LCR de vectors AAV9 que codifiquen per als enzims deficients^{11,14-19} (Fig. 7).

Els estudis dels tractaments de MPSII i MPSIII (A, B i D) per teràpia gènica mitjançada per vectors AAV9 en models animals petits i grans de les malalties han proporcionat proves que donen suport a l'eficàcia i la seguretat d'aquestes estratègies en la seva translació cap a la clínica, i s'espera que seran predictius de la possible eficàcia en pacients humans.

Per tal de poder portar aquestes teràpies cap a la clínica, el nostre grup a la UAB va establir el 2010 un partenariat públic-privat amb la companyia farmacèutica Esteve Pharmaceuticals. Aquesta col·laboració ha estat clau i ha permès avançar aquestes aproximacions terapèutiques gràcies a la combinació de l'expertesa en recerca bàsica preclínica del nostre grup juntament amb l'expertesa d'Esteve en l'àmbit regulador (interacció amb les agències del medicament), toxicològic i de disseny d'assaigs clínics. Actualment, ja s'han obtingut tres denominacions

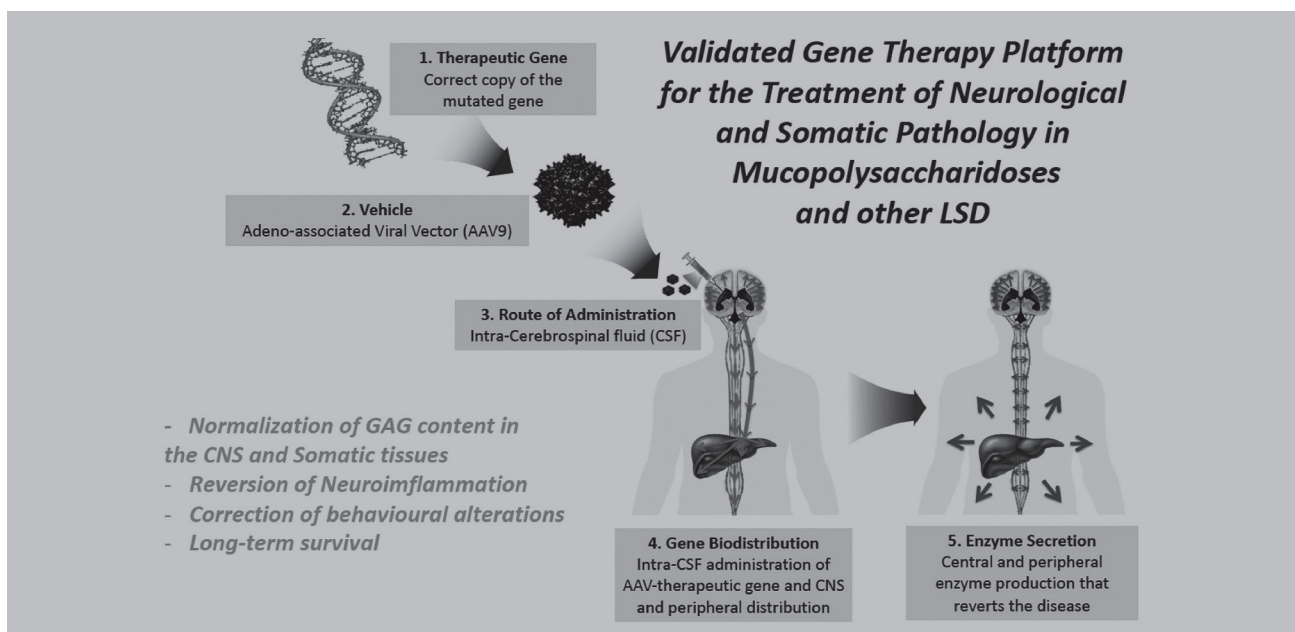
de medicaments orfes per part de l'EMA i de la FDA per als productes de teràpia gènica desenvolupats al nostre laboratori per al tractament de la MPSII, de la MPSIII A i de la MPSIII B. Recentment, Esteve ha iniciat un assaig clínic de fase I/II per al tractament de pacients amb MPSIII A (2015-000359-26, www.ClinicalTrialsregister.eu).

Els resultats de tots aquests estudis de teràpia gènica, mitjançada per vectors AAV administrats al LCR, seran també molt útils i de gran interès per al desenvolupament de nous tractaments d'altres malalties neurodegeneratives, no només minoritàries sinó també de trastorns del SNC d'alta prevalença fins ara no tractables.

Teràpia gènica per a malalties d'alta prevalença: la diabetis mellitus de tipus 1

La diabetis mellitus (DM) és la principal malaltia metabòlica que afecta la població a escala mundial. Actualment, s'ha convertit en un important problema de salut pública tant en països desenvolupats com en via de desenvolupament. La seva prevalença creix a un ritme alarmant i ara ja afecta >530 milions de persones a escala global i s'espera que arribi a >780 milions l'any 2045 (2021 International Diabetes Federation (IDF); <https://www.jdr.org/>).

Figura 7. Esquema representatiu de la plataforma de teràpia gènica mitjançada per vectors AAV administrats intra-LCR per al tractament de les MPS i altres malalties lisosòmiques. L'administració de vectors AAV9 al LCR, a través del ventricle lateral o de la cisterna magna, porta a una distribució generalitzada i uniforme de vectors AAV a tot el cervell i la medul·la espinal, ja que el LCR banya tot el SNC. A més, part del vector AAV9 arriba a la circulació, cosa que condueix a la transducció del fetge. Com a resultat d'aquesta distribució dels vectors AAV, l'activitat enzimàtica augmenta a tot el SNC, al LCR i al sèrum, en què el fetge és la font més important d'enzim circulant. També, hem demostrat en estudis en models animals seropositius que l'eficàcia terapèutica al SNC, després de l'administració dels vectors al LCR, no es veuria compromesa per la presència d'anticossos neutralitzadors anti-AAV9 al sèrum, ja que aquests no poden creuar la barrera hematoencefàlica.



Les dues formes principals de diabetis mellitus són la diabetis de tipus 1 (DT1) i la diabetis de tipus 2 (DT2). La DT1 i la DT2 són una de les principals causes de morbiditat i mortalitat arreu del món. Principalment a causa d'un mal control glucèmic, ambdues diabetis s'associen a complicacions secundàries molt severes responsables d'una pobra qualitat i esperança de vida dels pacients.

Actualment no hi ha cura per a la diabetis.

La DT1 només representa un 5-10% de la població diabètica i és el resultat de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules beta del pàncrees productores d'insulina. Els pacients desenvolupen hiperglucèmia i necessiten una teràpia substitutòria amb insulina per a sobreviure. No obstant això, aquesta teràpia és imperfecta, ja que

la glucèmia no sempre es regula adequadament i la hiperglucèmia crònica porta al desenvolupament de les greus complicacions microvasculars (retinopatia i nefropatia), macrovasculars (ictus i infart de miocardi) i neurològiques d'aquesta malaltia. La normalització dels nivells de glucosa en sang és fonamental per prevenir aquestes complicacions devastadores. La teràpia intensiva amb insulina pot

retardar l'inici i la progressió de les complicacions secundàries, però els pacients que reben aquesta teràpia presenten un risc elevat de desenvolupar episodis d'hipoglucèmia. Per això, cal desenvolupar noves aproximacions terapèutiques que permetin obtenir un millor control de la glucèmia.

Nosaltres des de fa anys estem treballant perquè considerem que la teràpia gènica podria proporcionar millors beneficis clínics a llarg termini. En especial, hem dissenyat i assajat noves estratègies per tractar aquesta malaltia mitjançant la manipulació genètica *in vivo* de diferents teixits utilitzant vectors AAV. No obstant, s'ha de tenir en compte que tant la DT1 com la DT2 són malalties poligèniques amb un fort component ambiental com a causa del seu desenvolupament. Aquest fet fa que el disseny de noves aproximacions de teràpia gènica sigui molt més complex.

En el cas de les malalties monogèniques, com a gen terapèutic a transferir s'utilitzava una còpia correcta del gen mutat. En el cas de la DM, no és clar quin pot ser un possible gen terapèutic a transferir i, per tant, es requereixen molts estudis sobre la fisiopatologia de la malaltia per tal d'identificar el possible gen o gens terapèutics candidats. També s'ha d'estudiar i seleccionar quin és el teixit diana sobre el qual s'hauria d'actuar per

contrarestar les alteracions metabòliques. A més, en el cas d'aquestes malalties tampoc no existeix un model animal que reproduïxi perfectament la patologia humana. Hi ha diversos models animals de DT1 acceptats en el camp. Per exemple, animals tractats amb estreptozotocina (destrueix cèl·lules beta pancreàtiques) o ratolins NOD (*non-obese diabetic*) com a models de DT1. Aleshores, per tal de demostrar que una teràpia gènica pot ser efectiva per contrarestar aquesta malaltia caldrà assajar-la en diversos models, cosa que complica molt els experiments a realitzar a fi de validar una nova aproximació terapèutica.

A continuació, es presenta una teràpia gènica que hem desenvolupat per a la DT1 que ja s'està avançant per portar-les cap a la clínica per tractar pacients humans.

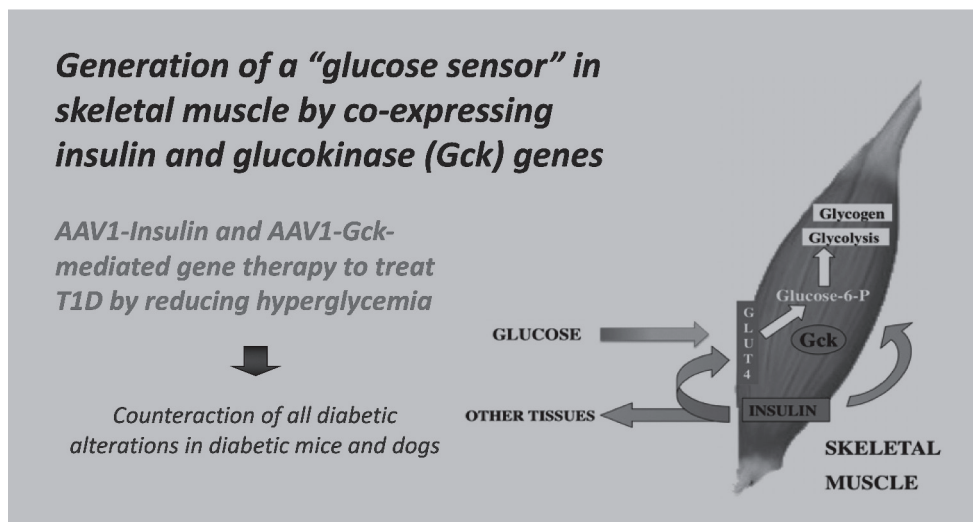
Teràpia gènica per a la diabetis de tipus 1 centrada en la generació d'un «sensor a la glucosa» en el múscul esquelètic, mitjançant la coexpressió dels gens de la insulina i la glucoquinasa

La regulació precisa de l'homeòstasi de la glucosa és un repte important en el control de la DT1. Per això, la manipulació genètica del múscul esquelètic per a combatre la hiperglucèmia és una estratègia atractiva per corregir la DT1. El múscul esquelètic és responsable

de l'eliminació del 70% de la glucosa que circula després d'un àpat. En els músculs, la utilització de la glucosa es controla mitjançant el transport de glucosa estimulat per la insulina, a través del transportador de glucosa tipus 4 (GLUT4)²⁰, i la fosforilació per l'hexoquinasa II (HKII), que té una Km baixa per a la glucosa i és inhibida pel seu producte, la glucosa-6-fosfat, i limita així la captació de glucosa²¹. En el múscul diabètic, a causa de la manca d'insulina, la translocació GLUT4 a la membrana plasmàtica i l'activitat HKII es troben disminuïdes. A diferència de l'HKII, l'enzim hepàtic glucoquinasa (Gck) té una elevada Km per a la glucosa, no és inhibida per la glucosa-6-fosfat i mostra cooperativitat cinètica amb la glucosa²². Quan vam expressar la Gck al múscul esquelètic de ratolins transgènics, vam observar que aquest enzim facilita la captació de glucosa només quan la glucosa en sang és elevada²³. No obstant això, durant la diabetis, es requereixen també nivells basals constants d'insulina per garantir la presència de GLUT4 a la membrana cel·lular i així permetre l'entrada de la glucosa.

Aquestes observacions ens van portar a la hipòtesi que la regulació de la glucèmia es podria aconseguir mitjançant la coexpressió al múscul esquelètic de la Gck, que incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa, i de nivells baixos d'insulina (Ins), que

Figura 8. Esquema representatiu de la teràpia gènica per a la DT1 centrada en la captació de glucosa pel múscul esquelètic. Expressió conjunta del gen de la insulina i el de la glucoquinasa al múscul esquelètic mitjançada per vectors AAV. Durant la diabetis, en presència d'hiperglucèmia, el múscul produiria nivells basals d'insulina, que incrementarien el transport de glucosa cap a l'interior de les fibres. Un cop dins, l'enzim Gck incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa gràcies a la seva elevada Km. Treballant en concert, tots dos gens permetrien restablir la normoglucèmia.



permetria la presència de GLUT4 a la membrana de les fibres musculars. En aquest sistema, la captació de glucosa es regula mitjançant els nivells de glucosa en la circulació sanguínia, de manera que permet la captació de glucosa només quan hi ha hiperglucèmia. D'acord amb això, vam demostrar que l'administració intramuscular conjunta de vectors AAV de serotip 1 (AAV1) que expressen Ins i Gck a ratolins

diabètics tenia com a resultat la correcció de totes les alteracions de la malaltia²⁴. Per tant, això demostrava que es podia generar un «sensor de la glucosa» al múscul esquelètic, mitjançant l'acció de la producció basal d'insulina conjuntament amb l'activitat Gck, que augmentava la captació de glucosa i portava a la correcció de la hiperglucèmia en ratolins diabètics (Fig. 8). A continuació, vam demostrar

l'eficàcia a llarg termini d'aquesta aproximació en un model animal gran de diabetis, gossos Beagle als quals havíem induït diabetis experimental com un pas necessari abans de poder aplicar-ho en pacients humans.

Una única administració intramuscular en gossos diabètics de vectors AAV del serotip 1 (AAV1) que codificaven per a Gck i Ins va resultar en la normalització de la glucèmia en dejú i l'eliminació ràpida de la glucosa després d'una sobrecàrrega oral del sucre (test de tolerància oral a la glucosa). A més, en els animals tractats amb la teràpia gènica no es van observar episodis d'hipoglucèmia durant l'exercici. Això es va associar amb la recuperació del pes corporal, la reducció dels nivells de proteïnes plasmàtiques glicosilades i la supervivència a llarg termini sense desenvolupar complicacions secundàries. Per contra, la transferència només del gen de la Ins o el de la Gck per separat no va aconseguir la correcció completa de la diabetis, cosa que indica que l'acció sinèrgica dels dos gens, Ins i Gck, és necessària per a obtenir un efecte terapèutic complet²⁵.

En realitzar un seguiment a llarg termini (aproximadament 8 anys) després d'una única administració de vectors terapèutics a gossos


diabètics, es va aconseguir un control de glucèmia al llarg dels anys sense la necessitat de suplementar-ho amb injeccions d'insulina exògena. La correcció metabòlica també es va demostrar mitjançant la normalització dels nivells sèrics de fructosamina, triglicèrids i colesterol. A més, es va observar, 8 anys després de l'administració dels vectors, la persistència de genomes virals i l'expressió dels transgens terapèutics en múltiples mostres obtingudes dels músculs tractats, el quals també mostraven una morfologia completament normal^{25,26}. Per tant, aquest estudi demostra l'eficàcia i la seguretat a llarg termini de la transferència dels gens de la insulina i la glucoquinasa en gossos diabètics i, especialment, la capacitat del sistema per a respondre als canvis en les necessitats metabòliques a mesura que els animals envelleixen (Fig. 9).

Aquest estudi proporciona la primera prova de concepte d'una aproximació de transferència de gens segura i eficaç a llarg termini per a tractar la DT1, i posa les bases per a la translació clínica d'aquesta aproximació a pacients humans en un futur. En aquest sentit, recentment, el 2020, la UAB ha llicenciat aquest projecte a una nova empresa de teràpia gènica dels

Figura 9. Tractament amb la teràpia gènica de la DT1 centrat en la manipulació genètica del múscul esquelètic perquè expressi el gen de la insulina i el de la glucoquinasa. Els resultats dels nostres estudis demostren que, després d'una única injecció intramuscular dels vectors, els transgens *Ins* i *Gck* actuen sinèrgicament per aconseguir un control estret de la glucèmia i prevenir les alteracions metabòliques característiques de la DT1.

AAV1-Ins+Gck gene therapy for Type 1 Diabetes

- Safe
- Long-term survival
- Recovery body weight
- Normal physical performance
- Normal serum parameters
- Normalization fasting glycemia
- Normal glucose tolerance
- No secondary complications



The system responds to the changes in metabolic needs as animals grow older

Estats Units, Kriya Therapeutics (<https://kriyatherapeutics.com/>), que ja ha iniciat tots els passos per portar a la clínica aquesta aproximació en un futur proper.

En resum, en aquesta presentació hem mostrat, amb uns pocs exemples, que actualment, si bé s'han desenvolupat nombroses teràpies gèniques pel tractament de malalties monogèniques minoritàries, a mesura que aquest camp arriba finalment a l'edat

madura, els coneixements adquirits en aquests primers tractaments representen un enorme potencial per millorar/revertir malalties complexes, no hereditàries i d'alta prevalença que afecten grans poblacions de pacients, com ara la diabetis mellitus. Les expectatives d'aquests desenvolupaments són enormes i representaran un nou paradigma en el tractament de moltes malalties humanes en un futur proper.

Referències

1. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18:358-78.
2. Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, Ramírez CM, Reyes LH, Cruz JC, et al. Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. *J Mol Med.* 2020;98:931-46.
3. Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:133-50.
4. Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med.* 2015;66:471-86.
5. Nagree MS, Scalia S, Mckillop WM, Medin JA. An update on gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19:655-70.
6. Valstar MJ, Ruijter GJ, Van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:240-52.
7. Fedele A. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *Appl Clin Genet.* 2015;8:269.
8. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr.* 2008;167:267-77.
9. Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, et al. Japan Elaprase® Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab.* 2010;99:18-25.
10. Yamada Y, Tomatsu S, Sukegawa K, Suzuki Y, Kondo N, Hopwood JJ, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease): 13 gene mutations in 52 Japanese patients and carrier detection in four families. *Hum Genet.* 1993;92:110-4.
11. Haurigot V, Marcó S, Ribera A, García M, Ruzo A, Villacampa P, et al. Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J Clin Invest.* 2013;123:3254-71.
12. Ruzo A, García M, Ribera A, Villacampa P, Haurigot V, Marcó S, et al. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther.* 2012;20:254-66.

13. Ruzo A, Marcó S, García M, Villacampa P, Ribera A, Ayuso E, et al. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2012;23:1237-46.
14. Ribera A, Haurigot V, García M, Marcó S, Motas S, Villacampa P, et al. Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2015;24:2078-95.
15. Motas S, Haurigot V, García M, Marcó S, Ribera A, Roca C, et al. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight.* 2016;1:e86696.
16. Roca C, Motas S, Marcó S, Ribera A, Sánchez V, Sánchez X, et al. Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID. *Hum Mol Genet.* 2017;26:1535-51.
17. Haurigot V, Bosch F. Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA. *Rare Dis.* 2013;1:e27209.
18. Marcó S, Haurigot V, Bosch F. In vivo gene therapy for mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome): a new treatment horizon. *Hum Gene Ther.* 2019;30:1211-21.
19. Marcó S, Haurigot V, Jaén ML, Ribera A, Sánchez V, Molas M, et al. Seven-year follow-up of durability and safety of AAV CNS gene therapy for a lysosomal storage disorder in a large animal. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021;23:370-89.
20. Kahn BB. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes.* 1996;45:1644-54.
21. Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, Moritz S, et al. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J Biol Chem.* 1993;268:5209-19.
22. Printz RL, Magnuson MA, Granner DK. Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:463-96.
23. Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jiménez R, Bosch F. Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther.* 2000;11:1543-52.
24. Mas A, Montané J, Anguela XM, Muñoz S, Douar AM, Riu E, et al. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes.* 2006;55:1546-53.
25. Callejas D, Mann CJ, Ayuso E, Lage R, Grifoll I, Roca C, et al. Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes.* 2013;62:1718-29.
26. Jaén ML, Vilà L, Elias I, Jiménez V, Rodó J, Maggioni L, et al. Long-term efficacy and safety of insulin and glucokinase gene therapy for diabetes: 8-year follow-up in dogs. *Mol Ther. Methods Clin Dev.* 2017;6:1-7.

Teràpia gènica i cel·lular: el camí per fer del laboratori a la capçalera de les persones malaltes

Michele Catanzaro

Més de 20 anys després de la seqüenciació del genoma humà, les promeses d'una medicina personalitzada generalitzada basada en la genòmica encara no s'han complert.

Tanmateix, hi ha raons per a l'esperança. Així ho va deixar clar la galeria d'investigacions presentades en la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya, a Barcelona, el 4 de maig de 2022, en ocasió dels 250 anys de l'entitat, amb el recolzament de la Fundació Dr. Antoni Esteve.

Algunes teràpies cel·lulars, com les cèl·lules CAR-T, ja s'estan emprant per tractar pacients. I hi ha prometedores vies obertes en teràpia gènica, cèl·lules mare del càncer, diagnòstic genètic i medicina computacional.

Roderic Guigó, coordinador del Programa de Bioinformàtica del Centre de Regulació Genòmica, va revisar el camí recorregut per la genètica, des del primer genoma humà, fins als estudis sobre les funcions de regions importants del genoma i l'anàlisi de l'ADN d'altres organismes per estudiar quin podria estar més afectat per la COVID-19, per exemple.

Anna Bigas, cap de grup de cèl·lules mare i càncer a l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, va repassar el coneixement sobre les cèl·lules mare de la sang i què aporten per entendre la leucèmia.

Elias Campo, director de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, va reflexionar

sobre l'impacte de la genòmica en el diagnòstic i va presentar evidències de que la mutació que matarà un pacient de leucèmia o limfoma està present, dècades abans de la mort, en un petit percentatge de les seves cèl·lules.

Agustí Barnadas, cap del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, va presentar els nombrosos avenços de la immunoteràpia dels tumors, molts ells ja emprats en el tractament de pacients.

Finalment, Fàtima Bosch, catedràtica de Bioquímica y Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, va posar de manifest el potencial de la teràpia gènica en el

tractament de malalties rares. També va presentar sorprenents resultats sobre la seva aplicació en gossos diabètics.

Un assumpte transversal a totes les presentacions va ser l'impacte de la computació aplicada a la biomedicina. «La integració de dades i la intel·ligència artificial serà una revolució amb un impacte enorme en la medicina moderna», va dir Luis Serrano, director del Centre de Regulació Genòmica.

«Una gran part de la medicina no es podrà fer sense el concurs de les tecnologies de la computació, des de la cirurgia fins al diagnòstic clínic per imatge», va coincidir Guigó. «Si som capaços d'aplegar i compartir les dades que es generen a Europa,

això repercutirà en el tractament de moltes malalties», va afegir Bigas.

A la teràpia genètica i cel·lular li queda un ardu camí de recerca per assolir la clínica. Però l'accés a aquestes tècniques també està dificultat pel seu alt cost. Teràpies innovadores, personalitzades o aplicades a condicions rares assoleixen ràpidament preus astronòmics, com els que tenen algunes teràpies CAR-T, per exemple.

«Les teràpies genètiques són cares, però es paguen una vegada a la vida», va observar Bosch. «És un sector molt jove que està intentant cobrar allò que ha invertit, però s'estan intentant reduir els costos de producció. El futur està en rebaixar costos», va afegir.

La qualitat de les ponències va posar de manifest que Catalunya té els elements i els protagonistes necessaris per desenvolupar una medicina de precisió d'alta qualitat, en opinió de Campo. «Necessitem un estudi clar dels beneficis que aquesta medicina personalitzada de base genòmica per reduir costos en els tractaments, a l'hora de fer tractaments més precisos», va explicar.

Campo veu un camí esperançador en els programes de diagnòstic genòmic existents, que de moment són de petita escala, a l'emprar pocs gens. «El camí està encetat, els protagonistes els tenim aquí: necessitem avançar per expandir aquests estudis genòmics en la clínica de forma decidida», va concloure.

Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve

Podeu sol·licitar o descarregar els quaderns a través de www.esteve.org.

1. Guardiola E, Baños JE. Eponímia mèdica catalana. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 1. Barcelona: Prous Science; 2003.
2. Debates sobre periodismo científico. A propósito de la secuenciación del genoma humano: interacción de ciencia y periodismo. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 2. Barcelona: Prous Science; 2004.
3. Palomo L, Pastor R, coord. Terapias no farmacológicas en atención primaria. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 3. Barcelona: Prous Science; 2004.
4. Debates sobre periodismo científico. En torno a la cobertura científica del SARS. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 4. Barcelona: Prous Science; 2006.
5. Cantillon P, Hutchinson L, Wood D, coord. Aprendizaje y docencia en medicina. Traducción al español de una serie publicada en el British Medical Journal. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 5. Barcelona: Prous Science; 2006.
6. Bertomeu Sánchez JR, Nieto-Galán A, coord. Entre la ciencia y el crimen: Mateu Orfila y la toxicología en el siglo XIX. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 6. Barcelona: Prous Science; 2006.
7. De Semir V, Morales P, coord. Jornada sobre periodismo biomédico. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 7. Barcelona: Prous Science; 2006.
8. Blanch LI, Gómez de la Cámara A, coord. Jornada sobre investigación en el ámbito clínico. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 8. Barcelona: Prous Science; 2006.
9. Mabrouki K, Bosch F, coord. Redacción científica en biomedicina: Lo que hay que saber. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 9. Barcelona: Prous Science; 2007.
10. Algorta J, Loza M, Luque A, coord. Reflexiones sobre la formación en investigación y desarrollo de medicamentos. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 10. Barcelona: Prous Science; 2007.
11. La ciencia en los medios de comunicación. 25 años de contribuciones de Vladimir de Semir. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 11. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2007.
12. Debates sobre periodismo científico. Expectativas y desencantos acerca de la clonación terapéutica. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 12. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2007.
13. González-Duarte R, coord. Doce mujeres en la biomedicina del siglo XX. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 13. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2007.
14. Mayor Serrano MB. Cómo elaborar folletos de salud destinados a los pacientes. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 14. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2008.
15. Rosich L, Bosch F, coord. Redacción científica en biomedicina: El que cal saber-ne. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 15. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2008.
16. El enfermo como sujeto activo en la terapéutica. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 16. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2008.
17. Rico-Villademoros F, Alfaro V, coord. La redacción médica como profesión. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 17. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2009.
18. Del Villar Ruiz de la Torre JA, Melo Herráiz E. Guía de plantas medicinales del Magreb. Establecimiento de una conexión intercultural. Cuadernos de la Fundación

- Dr. Antonio Esteve, N° 18. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2009.
19. González-Duarte R, coord. Dotze dones en la biomedicina del segle xx. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 19. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2009.
 20. Serés E, Rosich L, Bosch F, coord. Presentaciones orales en biomedicina. Aspectos a tener en cuenta para mejorar la comunicación. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 20. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2010.
 21. Francescutti LP. La información científica en los telediarios españoles. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 21. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2010.
 22. Guardiola E, Baños JE. Eponímia mèdica catalana (II). Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 22. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2011.
 23. Mugüerza P. Manual de traducción inglés-español de protocolos de ensayos clínicos. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 23. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2012.
 24. Marušić A, Marcovitch H, coord. Competing interests in biomedical publications. Main guidelines and selected articles. Esteve Foundation Notebooks, N° 24. Barcelona: Esteve Foundation; 2012.
 25. De Semir V, Revuelta G, coord. El periodismo biomédico en la era 2.0. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 25. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2012.
 26. Casino G, coord. Bioestadística para periodistas y comunicadores. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 26. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2013.
 27. Carrió M, Branda LA, Baños JE, coord. El aprendizaje basado en problemas en sus textos. Ejemplos de su empleo en biomedicina. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 27. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2013.
 28. El científico ante los medios de comunicación. Retos y herramientas para una cooperación fructífera. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 28. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2013.
 29. Giba J. Developing skills in scientific writing. Esteve Foundation Notebooks, N° 29. Barcelona: Esteve Foundation; 2014.
 30. Bigorra J, Bosch F, coord. Filantropía en investigación e innovación biosanitaria en Cataluña. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 30. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2014.
 31. Francescutti LP. Los públicos de la ciencia. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 31. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2014.
 32. Casino G, Fernández E, coord. Epidemiología para periodistas y comunicadores. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 32. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2014.
 33. Gallego Borghini L. La traducción inglés-español del consentimiento informado en investigación clínica. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 33. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2015.
 34. Casino G. Escepticismo. Una mirada escéptica sobre la salud y la información. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 34. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2015.
 35. De la Torre T, coord. La Medicina en las series de televisión. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 35. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 36. Hernández I, coord. Definición de prioridades en políticas de salud. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 36. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 37. Mayor Serrano MB. El cómic como recurso didáctico en los estudios de Medicina. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 37. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 38. Guardiola E, Baños JE. Eponímia mèdica catalana (III). Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 38. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 39. Claros Díaz MG. Ideas, reglas y consejos para traducir y redactar textos científicos en español. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 39. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 40. Revuelta G, Morales P, coord. Debate sobre periodismo científico. El tratamiento informativo del brote epidémico del virus del Ébola. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 40. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2016.
 41. Valls R, Bigorra J, coord. Philanthropy in research and innovation in biosciences. Esteve Foundation Notebooks, N° 41. Barcelona: Esteve Foundation; 2017.
 42. De la Torre T, coord. Medicine in Television Series. Esteve Foundation Notebooks, N° 42. Barcelona: Esteve Foundation; 2017.
 43. Lumberas B, Ronda E, Ruiz-Cantero M^a T, coord. Cómo elaborar un proyecto en ciencias de la salud Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 43. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2018.

44. Francescutti P. La visibilidad de las científicas españolas. Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 44. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2018.
45. Cererols R, De la Torre T. La ciencia de The Big Bang Theory. Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 45. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2018.
46. Mugüerza P. Manual de traducción inglés-español de protocolos de ensayos clínicos. 2ª edición revisada. Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve, N° 46. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2019.
47. Estopà R, coord. L'informe mèdic: com millorar-ne la redacció per facilitar-ne la comprensió. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 47. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2018.
48. Jar N, Díez D, Morales P, coord. La ciencia impaciente durante la COVID-19. Errores y desafíos en la comunicación de la investigación farmacológica en torno a la COVID-19. Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 48. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2021.
49. Cererols R, De la Torre T. La ciencia en las series de televisión. Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 49. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2021.
50. Julià MA, Bosch F, Serés E, coord. Diccionari multilingüe de la COVID-19: Cinc-cents termes per a entendre la pandèmia. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 50. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2022.
51. Francescutti P. La ciencia y la tecnología en la ficción audiovisual española. Análisis de las películas y series de ciencia ficción entre 2015 y 2020. Cuadernos de la Fundación Dr. Antoni Esteve, N° 51. Barcelona: Fundación Dr. Antoni Esteve; 2022.
52. Guardiola L, Baños JE. Eponímia mèdica catalana (IV). Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve, N° 52. Barcelona: Fundació Dr. Antoni Esteve; 2022.

Representants dels centres
de recerca més punters en
teràpies avançades commemoren
els 250 anys de la Reial Acadèmia
de Medicina de Catalunya

