

3/
21.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

LA TERAPIA GENICA, SU ESTADO
ACTUAL Y PROYECTOS A FUTURO.

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION**
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
GEORGINA FLORES SEGOVIANO



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Kono Yaico Gerardo
Vocal	Prof. Lopez Lopez Marisol
Secretario	Prof. Cervantes Peredo Alicia
1er. suplente	Prof. Resendiz Vázquez Bertha
2do. suplente	Prof. Cevallos Ferriz Maria Estela

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA
Servicio de Genética, Hospital General de México.



Asesor del Tema

Q.F.B. Alicia Cervantes Peredo



Sustentante

Georgina Flores Segoviano

A MIS PADRES

Amigos incondicionales,
que con amor, paciencia y carácter
me ayudaron a conseguir esta meta

A KARY, MI HERMANA

Por su tolerancia, franqueza,
y cariño desinteresado.

A MIS PROFESORES DE GENÉTICA

Gerardo Keno, Alicia y Marisol,
quienes por su dedicación y vocación a la enseñanza
lograron despertar en mí, el interés por el área de la
Genética de la cual aun queda tanto por descubrir.

Un especial agradecimiento a Alicia.

A MIS AMIGOS, FAMILIARES, COMPAÑEROS Y PROFESORES

Por su apoyo, amistad y confianza en mi labor de estudiante.

A JUAN RAMÓN,

Dame Señor,

agudeza para entender,
capacidad para retener,
método y facultad para aprender,
sutileza para interpretar,
gracia y abundancia para hablar.

Dame Señor,

acierto al empezar,
dirección al progresar
y perfección al acabar.

Santo Tomás De Aquino

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

Capítulo 1

TERAPIA GÉNICA

definición	1
antecedentes históricos	1

Capítulo 2

TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA

técnicas virales	8
técnicas no virales.....	19

Capítulo 3

ALCANCES DE LA TERAPIA GÉNICA

tejidos blanco.....	40
estrategias de la Terapia Génica	43

Capítulo 4

APLICACIONES CLÍNICAS

enfermedades hereditarias	56
enfermedades adquiridas	87
protocolos clínicos actuales	103

Capítulo 5

CONSIDERACIONES ÉTICAS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha sido la promesa de esta última década para el mejoramiento de la práctica médica. Esto ha traído consigo una aplicación mayor en la prevención de las enfermedades pero también ofrece avances en el tratamiento. Esto puede ser convenientemente discutido bajo tres conceptos: un Diagnóstico Clínico más preciso, Biosíntesis y Terapia Génica. El primero, gracias al avance de la biología molecular ha logrado acercarse más a la causa u origen del padecimiento. La biosíntesis por otra parte implica la inserción de un gen humano que codifica para un péptido terapéuticamente importante, dentro de un vector apropiado, el cual es posteriormente clonado. De esta manera el péptido puede ser sintetizado en cantidades significativas y debe probar ser más económico y seguro que las usuales y laboriosas alternativas de extracción y purificación a partir de tejidos humanos. Y finalmente, la Terapia Génica se refiere al tratamiento de la enfermedad genética mediante el reemplazo o corrección del gen mutado o defectuoso. Es importante distinguir que la biosíntesis corrige la enfermedad a nivel de sus consecuencias metabólicas secundarias mientras que la Terapia Génica lo hace a nivel del defecto genético encontrado, por lo que se trata de dos conceptos distintos.

La Terapia Génica como un avance legítimo al tratamiento de la enfermedad genética encontró su expresión inicial en la biología molecular. El advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, la habilidad para aislar y manipular grandes cantidades de secuencias genéticas purificadas y el desarrollo de medios físicos y químicos para introducir estas secuencias en células de mamíferos parecen poner el escenario para un rápido progreso del concepto de Terapia Génica hacia la clínica. Un intento fallido de tratamiento clínico en

1980, junto con las dificultades técnicas que se presentaron para obtener una eficiente transferencia genética desalentaron el entusiasmo de algunos. Sin embargo, los debates públicos y éticos acerca de la Terapia Génica comenzaron formalmente en Estados Unidos a principios de los 80's y culminaron con la formación del Subcomité de Terapia Génica Humana del RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) en 1985.

La Terapia Génica está surgiendo rápidamente como una revolucionaria forma de tratamiento encaminada a enfermedades genéticas, malignas e infecciosas. El uso clínico del material genético para terapia ha tenido una gran aceptación científica, médica y pública. En la actualidad, se han desarrollado una gran variedad de métodos para introducir el DNA a las células, el método de elección dependerá del tejido al que le será enviado el gen. Estas técnicas de transferencia pueden ser agrupadas en 4 categorías: virales (retrovirus y adenovirus), químicas (introducción del DNA mediante $Ca^{++}(PO_4)_2$), de fusión (conjugados de DNA, liposomas) y físicas (microinyección y electroporación). La mayoría de los protocolos clínicos emplean vectores virales usando retrovirus, debido a que para la mayoría de los casos son un medio seguro y eficiente de transferencia genética.

A pesar de los enormes avances que han ocurrido en las bases científicas de la Terapia Génica, las aplicaciones clínicas son pocas debido a las enormes complejidades implicadas. Las tecnologías existentes no permiten la reparación de mutaciones dominantes, solo se limitan a desordenes que puedan ser eliminados mediante una suplementación genética, estos incluyen a los desordenes recesivos como hemofilia y enfermedades genéticas adquiridas como cáncer. El reemplazo genético de células somáticas no altera la composición genética de células germinales. Esto nos lleva a pensar en un principio similar al de los procedimientos médicos actuales como trasplantes de órganos, los cuales han sido éticamente aceptados.

Varios investigadores comprenden bien que las herramientas disponibles para la transferencia de genes terapéuticos en las células humanas defectuosas son probablemente

inadecuados y que mayores mejoras en los presentes métodos de transferencia génica serán requeridos para producir resultados clínicos verdaderamente útiles. Aun así, existen cerca de 100 estudios clínicos de Terapia Génica aprobados por las organizaciones reguladoras. Sería inadecuado sugerir que los estudios clínicos deben esperar hasta un desarrollo más apropiado o herramientas ideales, ya que esto podría tardar años y los pacientes con enfermedades incurables presentan una alta mortalidad.

El propósito de este trabajo es realizar una profunda revisión sobre lo que es la Terapia Génica, las técnicas de transferencia que han sido desarrolladas, así como los alcances y limitaciones que ha tenido desde sus orígenes hasta nuestros días.

OBJETIVOS

11-00004

Objetivo General

Introducir al conocimiento de la Terapia Génica así como a los avances logrados recientemente y a las metas futuras que se tienen consideradas.

Objetivos Específicos

- Definir que es la Terapia Génica.
- Establecer las estrategias y herramientas con que se cuenta en la actualidad, así como reconocer la importancia de su perfeccionamiento.
- Conocer su campo de aplicación y evaluar el alcance que puede lograr a futuro.
- Considerar los aspectos legislativos, éticos y morales relacionados con esta innovadora terapia.

DEFINICIÓN

La Terapia Génica puede ser definida como el tratamiento de una enfermedad con agentes terapéuticos producidos *in vivo*, a partir de un material genético nuevo que es introducido en el paciente¹.

Su objetivo es la producción de una proteína o de un mRNA que mejore su condición, ya sea mediante el reemplazo o suplementación de un producto genético requerido para un metabolismo normal, pero que está ausente o defectuoso debido a una mutación en la línea germinal; o bien, aboliendo el efecto de una condición adquirida.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La Terapia Génica no es un concepto nuevo, como generalmente se piensa. La idea de que los genes podían ser utilizados para tratar enfermedades humanas se remonta varias décadas, de hecho, muchos de los pioneros de la genética sabían que sus descubrimientos llegarían a tener una aplicación clínica. Tiempo atrás del descubrimiento del gen, se practicaba ya la manipulación genética, desde tiempos ancestrales se utilizaron a plantas y animales con fines específicos, dichas prácticas selectivas fueron la base de la genética moderna. El primer Congreso Internacional de Genética se realizó en 1899 en Londres, aunque entonces se conoció como Conferencia Internacional de Hibridación en la Cruz y Crianza de Variedades. Fue William Bateson quien propuso el uso del término "genética" hasta el Tercer Congreso en 1906. Posteriormente, el trabajo de Mendel fue retomado por Hugo de Vries y otros originándose así el concepto de gen como unidad de herencia. Uno de los primeros usos del término "ingeniería genética" fue en el título presentado en el Sexto

Congreso Internacional de 1932 en Ithaca, Nueva York. La Ingeniería Genética fue definida como la aplicación de los principios genéticos a las especies animales y vegetales.

El concepto de Terapia Génica se encuentra dentro del contexto de las tradiciones farmacológicas y quirúrgicas y puede ser definida como la aplicación de los principios genéticos al tratamiento de la enfermedad humana. Este término une a la farmacoterapéutica con los principios genéticos en el momento en que se hace uso de un polinucleótido para tratar una enfermedad.

En 1878, Langley propuso el concepto de sustancia receptora, ahora conocido como receptor³. Tiempo después Clark desarrolla la hipótesis de que las interacciones entre un fármaco y su receptor están gobernadas por la Ley de acción de masas; de este modo, el entendimiento molecular de la función proteica y la acción enzimática permitió el diseño de fármacos basados en un receptor blanco o un sitio activo. La Terapia Génica con genes antisentido y ribozimas representan una extensión de este concepto. De hecho, podemos decir que una expresión transitoria de genes exógenos semeja a las terapias de reemplazo proteico mientras que la Terapia Génica con una incorporación permanente del gen terapéutico en los cromosomas celulares es comparable con la cirugía donde el tejido u órgano es modificado de por vida⁴.

La Genética molecular es quien abre paso a la Terapia Génica con el trabajo de Avery, MacLeod y McCarthy publicado en 1944, quienes descubrieron que los genes pueden ser transferidos en los ácidos nucleicos⁵ y posteriormente con el hallazgo de la capacidad de los virus para transmitir genes por Zinder y Lederberg en 1952⁶. Sin embargo, no es hasta mayo de 1966 que Edward Tatum predice que los virus pueden ser utilizados para transducir genes, él estaba totalmente convencido de que un conocimiento profundo de la estructura y función de los genes haría posible una Terapia Génica. Años más tarde, Arthur Kornberg logra replicar *DNA in vitro*, lo cual representa un importante avance rumbo a la Terapia Génica. A principios de los setentas, la Terapia Génica se convirtió en el tema

central de diversos artículos y conferencias. Aposhian en la reunión de 1969 menciona: "Si se considera como propósito de un fármaco el restablecer la función normal del cuerpo humano, el DNA debe ser considerado entonces el fármaco más innovador"⁴.

En 1970, B. Davis discute sobre la ingeniería genética humana y la ética a seguir sobre las alteraciones a células germinales, la clonación de humanos, modificaciones genéticas de conducta, predeterminación del sexo y reproducción selectiva⁵.

Como todo nuevo método la transferencia génica, base de la Terapia Génica, tuvo sus inicios en especies inferiores. El experimento que demostró con éxito la efectividad de la Terapia Génica, fue el trabajo que se realizó en *Drosophila*, en donde el factor P(transposon) se empleó para transferir un gen normal que codificaba para la enzima que produce el color rojo del ojo (tipo silvestre), a un embrión de *Drosophila*, el cual tenía este gen defectuoso. El resultado fue que las moscas tratadas adquirieron un color normal de ojo⁶.

Otros experimentos similares utilizaron este camino para la transferencia de genes distintos. La posibilidad de una terapia basada en la transferencia génica fue demostrada a principios de los 70's cuando virus tumorales (DNA y RNA) fueron usados exitosamente para introducir información genética nueva en los genomas de células de mamíferos. Se encontró que los retrovirus eran estructural y funcionalmente similares a los transposones, por lo que fueron empleados en la transferencia de genes en células de médula ósea de ratón⁷.

La primera "cura" genética reportada en mamíferos fue en una cepa de ratones llamada *little*, estos presentaban una mutación que se reflejaba en bajos niveles séricos de la hormona del crecimiento, por lo cual los ratones eran enanos. La enfermedad equivalente en el hombre es el enanismo pituitario. Hammer y colaboradores insertaron un gen de rata que codifica para la hormona de crecimiento en las células de estos ratones de tal suerte que el gen fue expresado en niveles altos. La deficiencia de la hormona fue corregida, pero el

gen no fue controlado apropiadamente por lo que se presentó gigantismo alcanzándose tallas una y media veces mas grandes de lo normal⁹.

En un principio, los investigadores pensaron que las enfermedades genéticas humanas mas factibles a ser tratadas con Terapia Génica eran anomalías en la hemoglobina, (especificamente β talasemia) debido a que estos desordenes implican a las células sanguíneas y la médula ósea es el tejido mas fácil para ser manipulado *in vitro*. Tal es el caso del trabajo reportado en 1980 por Mercola¹⁰ quien trato de transfectar el gen de la β -globina mediante fosfato de calcio a células de médula ósea de pacientes con talasemia. Sin embargo, debido a que la síntesis de globina es particularmente complicada por su composición y tipos distintos, el experimento no tuvo éxito y fue criticado por razones tanto de procedimiento como científicas. Esto dio origen a debates éticos sobre Terapia Génica Humana, culminando con la formación de un Subcomité de Terapia Génica Humana derivado del RAC ("Recombinant DNA Advisory Committee"). En 1985 el NIH ("National Institute of Health") decidió que todos los futuros estudios de Terapia Génica humana, en Estados Unidos, tendrían que ser aprobados por el mismo⁹.

Por ello, la Terapia Génica tuvo que ser aplicada con genes que codifican para proteínas que se regulan de una manera mas simple. Tres genes fueron los primeros candidatos: el que codifica para la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), ausente en la enfermedad de Lesch Nyhan; el de la purina nucleosido fosforilasa (PNP), ausente en la Inmunodeficiencia Severa; y el que codifica para la adenosin deaminasa (ADA), ausente en la Inmunodeficiencia Severa Combinada.

El tratamiento de enfermedades humanas en células somáticas por medio de la transferencia genica ha dejado de ser solo teoría para convertirse en una realidad. Esto no hubiera sido posible sin el gran desarrollo de nuevas técnicas moleculares empleadas en la manipulación de material genético y en el diagnóstico. El primer protocolo de Terapia Génica Humana aprobado por el RAC inició en septiembre de 1990 e implicaba la

transferencia del gen de ADA a los linfocitos de un paciente que presentaba un defecto letal en esta enzima¹¹. Los resultados de este tratamiento fueron muy alentadores lo cual permitio continuar con una mas amplia investigacion en este campo.

Desde entonces un gran numero de protocolos clinicos han sido desarrollados en los 5 continentes incrementandose exponencialmente. Las aplicaciones encontradas conciernen no sólo a enfermedades producidas por errores metabolicos, sino también a enfermedades adquiridas como son el cáncer y algunas enfermedades infecciosas.

INTRODUCCIÓN

La Terapia Génica implica pasos distintos e independientes como son la administración, envío y expresión del gen. La administración se refiere a la introducción del gen o de la formulación que lo contiene dentro del organismo. El envío o transferencia abarca la translocación del gen, desde el sitio de administración hasta el núcleo de la célula blanco. La transferencia implica directamente la biodisponibilidad del gen, su entrada a la célula y su tráfico intracelular hasta llegar al núcleo. Finalmente, la expresión se relaciona con la fabricación del producto génico terapéutico en la célula, incluyendo los pasos de transcripción, traducción y modificaciones post-traduccionales¹².

La transducción a células blanco apropiadas representa el paso crítico en la Terapia Génica. Consecuentemente, se ha puesto un gran empeño en el desarrollo de métodos de transferencia génica que permitan diferentes formas de terapia; todos ellos buscando una eficiente introducción de genes a las células¹³. Las primeras estrategias de transferencia génica exploradas fueron la inyección directa o inhalación y las modificaciones realizadas *ex-vivo* en donde a partir de una biopsia del tejido requerido, que se siembra y se le introduce el gen terapéutico utilizando distintos métodos, se obtienen células modificadas que son regresadas al paciente; este último método es el más utilizado ya que tiene la ventaja de que se puede asegurar una transferencia génica efectiva antes de ser regresadas las células modificadas al paciente (fig.2.1).

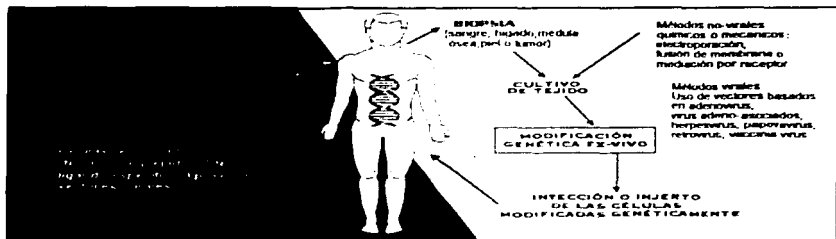


FIG. 2.1
ENTRATEGIAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA¹

Los experimentos para probar las primeras hipótesis de Terapia Génica se basaron en que las células podían ser transformadas permanentemente por medio del DNA introducido y así restablecerse la función genética perdida. Para esto utilizaron líneas celulares mutadas, transfectadas con DNA mediante fosfato de calcio. A partir de entonces, comenzaron a desarrollarse diversas técnicas de transferencia. En la actualidad, se eligen de acuerdo con el tipo de célula blanco y el gen terapéutico¹⁴.

En 1984 W. French Anderson¹⁵ clasificó estas técnicas de transferencia en:

- Virales, donde se emplean retrovirus, adenovirus, herpes virus, etc.
- Químicas, como la mediada con fosfato de calcio, (por cambios en permeabilidad de membrana).
- De Fusión, se refiere a la fusión del DNA con vesículas membranosas como liposomas, células rojas fantasma o protoplasmas, y
- Físicas, como la microinyección y la electroporación.

Una manera más general de clasificar las técnicas de transferencia, incluyendo las más recientes, es agrupándolas en: virales y no virales.

TÉCNICAS VIRALES

Los virus han sido empleados como vectores biológicos, encargados de llevar hasta el interior de la célula huésped el gen terapéutico y potenciar su lectura dentro de la misma. El principio de la transferencia genica viral es reemplazar los genes que codifican para funciones virales, por genes que codifiquen para funciones terapéuticas dentro de las partículas virales infecciosas, sin eliminar su habilidad para infectar a la célula blanco eficientemente y dirigir la expresión del producto génico. Para que cualquier vector viral sea considerado un posible medio de transferencia en Terapia Génica, es necesario que reúna tres características básicas: ser innocuo, estable y funcional. Es por ello que todo vector recombinante que se construya deberá tener la capacidad de infectar a la célula pero no de replicar libremente. Los investigadores han ido profundizando en el estudio de los mecanismos de replicación que sigue cada género de virus, y esto les ha permitido avanzar incluso en el conocimiento de la oncogénesis viral. Se han encontrado virus con mecanismos de replicación sencillos como es el caso de retrovirus y otros complejos como los herpesvirus, de los cuales su utilización en la clínica aún es riesgosa¹³.

De los vectores virales construidos, los retrovirales son los más ampliamente utilizados para Terapia Génica, sin embargo, debido a que presentan ciertas limitaciones se han desarrollado otros vectores virales como los basados en adenovirus, virus adenoasociados y herpes virus entre otros.

RETROVIRUS

La mayoría de los tratamientos clínicos ya aprobados de Terapia Génica se basan en el uso de vectores derivados de retrovirus. Estos virus contienen su información genética en moléculas de RNA, poseen dos genomas de cadena sencilla idénticos empacados en cada partícula viral. Su envoltura contiene cierta proteína (env) que se encuentra embebida en la bicapa lipídica, derivada de la membrana de la célula huésped. Dentro de la envoltura, se

encuentra el "núcleo" que contiene proteínas estructurales de la cápside (*gag*); la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa, dos enzimas esenciales para su replicación e integración a los cromosomas huéspedes. El primer paso en la infección viral es el ataque del virus a la superficie celular, para lo cual se requiere una interacción entre la proteína de la envoltura viral y un receptor celular. Algunos de los receptores identificados son: el transportador de aminoácidos catiónicos para el virus de Leucemia Murina Etrópica (VLM); el transportador de fosfato como receptor del virus de leucemia murina antrópica y la molécula de superficie CD4 como receptora del virus tipo 1 de Inmunodeficiencia Humana. Además del ataque celular, la proteína de envoltura también es responsable de la penetración del "núcleo" viral en la célula infectada. Una vez que ha entrado a la célula, en el citoplasma, el RNA del retrovirus es transcrito inversamente (por medio de la RT) a un DNA lineal de cadena doble. Durante esta transcripción, se produce un par de repetidos llamados LTRs ("long terminal repeats") los cuales flanquean los genes virales y son generados a partir de los extremos 5' y 3' del RNA viral. La importancia de estos radica en su contenido de "enhancers" (amplificadores de transcripción), esenciales para promover la transcripción del DNA viral. El DNA viral es entonces transportado dentro del núcleo y se integra al azar en los cromosomas huéspedes. En algunos casos, como el del virus VLM, la integración dependerá de la mitosis de la célula huésped, ya que se requiere de la ruptura de la membrana nuclear para permitir la entrada del complejo de preintegración viral al núcleo¹³. La integración del retrovirus, catalizada por la integrasa, es un evento muy bien ordenado que requiere de la presencia de secuencias específicas en los LTRs para una correcta integración¹⁴.

Construcción Del Vector Viral Para la construcción del vector retroviral es necesario conservar secuencias esenciales del ciclo de vida del virus, como serían: ambos LTRs, que además de contener pequeños repetidos invertidos esenciales para la integración del DNA viral, contienen señales para la iniciación de la transcripción y poliadenilación de

los RNAs virales: una secuencia llamada sitio de unión del iniciador (pbs "primer binding site"), que se encuentra inmediatamente después del LTR 5' y une a RNA celular e inicia la síntesis de la cadena (-) de DNA viral; una secuencia rica en purina (pu) que inicia la síntesis de la cadena (+) de DNA viral; y la señal Ψ , importante para un eficiente empaque de RNA viral en las nuevas partículas virales. Estas secuencias han sido localizadas en ambos extremos del DNA proviral (fig. 2.2). A diferencia de las secuencias anteriores, los genes que codifican las proteínas virales (causantes de la infección), no son indispensables para la replicación y empaque por lo que pueden ser reemplazadas con secuencias externas de DNA, requeridas para la corrección del defecto genético (genes terapéuticos)¹³.

Un avance importante en el desarrollo de estos vectores ha sido la generación de líneas celulares llamadas de empaque, en donde se producen vectores retrovirales libres de contaminación de otros virus (conocidos como virus silvestres o cooperadores) los cuales podrían diseminarse entre las células y traer consecuencias no deseadas. De esta manera al introducirse el DNA modificado del retrovirus a estas células, se producen víriones que pueden infectar a sus células blanco pero no seguir diseminándose.

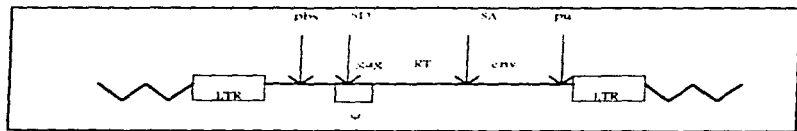


FIG. 2.2

GENOMA PROVIRAL DEL VIRUS DE LEUCEMIA MURINA¹³

Las líneas quebradas de los extremos representan al DNA celular que flanquea al DNA viral integrado. LTR, "long terminal repeat", pbs, sitio de unión del iniciador, SD, sitio de sobrelapamiento del donador, SA, sitio de sobrelapamiento del aceptor, pu, secuencia rica en purinas, Ψ señal de empaque.

Como es de esperarse, el uso de vectores retrovirales presenta ventajas y desventajas. Algunas de las ventajas que podemos considerar son que el receptor para estos virus es expresado por muchas células de mamíferos, por lo cual éstas son susceptibles de ser infectadas. La transferencia genica es eficiente y su integración es precisa. Los LTRs proveen de secuencias de promotores y amplificadores eficientes que funcionan en diversos tipos de células dirigiendo la expresión del gen de interés insertado. Además se han diseñado nuevas estrategias para la generación de líneas celulares que permitan obtener un alto título de vectores retrovirales libres de virus contaminantes¹⁷.

Sin embargo, las desventajas que presenta el uso de vectores retrovirales, es su incapacidad para infectar células que no se replican. Muchos protocolos actuales de Terapia Génica Humana implican una transducción genética en células primarias de cultivo y posteriormente su trasplante a los pacientes. Debido a que estos métodos de trasplante suelen ser problemáticos, se ha buscado desarrollar técnicas de transferencia directa *in vivo*. Los vectores retrovirales presentan dos desventajas más: la primera de ellas es su baja infectividad, una posible explicación a esta observación es la baja cantidad de receptores que las células humanas presentan para el virus. La segunda desventaja es que, a pesar de que se ha logrado generar un título alto del virus (del orden de 10^6 a 10^7 PFU/ml), por medio de las líneas celulares, este no ha sido suficiente para una aplicación *in vivo*. Posibles soluciones a este problema han sido la ultracentrifugación (en donde se ha presentado pérdida de infectividad por el daño que sufren las proteínas de la envoltura), la ultrafiltración (lográndose incrementar 50 veces la concentración) y la estrategia más reciente es la llamada formación pseudotipo, generándose mediante ella, partículas virales con una gran capacidad para infectar células humanas. Esta formación pseudotipo ocurre en células no infectadas con dos virus, relacionados o no relacionados, resultando así, partículas virales que poseen el genoma de un virus y las proteínas de envoltura del otro¹⁸. Otro problema que se presenta es el hecho de no poder caracterizar por completo al vector

retroviral producido en las células de empaque, por lo cual es necesario hacer un examen exhaustivo de estas líneas celulares para prevenir secuencias contaminantes ya sea de la célula o de microorganismos. Finalmente se ha discutido la posibilidad de que los vectores retrovirales sean oncogénicos debido a que su inserción puede activar oncogenes celulares¹⁴.

ADENOVIRUS

Los vectores de estos virus han sido empleados en cerca de 10% de los protocolos de Terapia Génica ya aprobados por el "Recombinant Advisory Committee", por lo cual, este tipo de vectores resultan ser uno de los más prometedores sistemas de transferencia génica en la actualidad.

Los adenovirus son virus icosaédricos con un DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 36kb y que no poseen envoltura. Su "núcleo" se encuentra protegido por las proteínas de la capsida. Se conocen a la fecha 42 serotipos que infectan a humanos, de los cuales los serotipos 2, 5 y 12 se encuentran bien caracterizados¹⁵. Los adenovirus humanos producen problemas en las vías respiratorias altas y bajas, como influenza, faringitis, conjuntivitis y neumonía entre otros. Su ciclo replicativo se encuentra dividido en dos fases: Temprana (E) que se inicia desde la entrada de los templados y termina antes de la replicación del DNA viral; y la Tardía (L), la que comienza con la replicación del DNA. La mayoría de las regiones tempranas tienen promotores separados (en "trans"). Los transcritos tempranos han sido clasificados en: tempranos inmediatos (E1A), tempranos intermedios (E1A2, X) y tempranos retrasados (E1B, E2A, E2B, E3 y E4). El genoma de los adenovirus es expresado de una manera regulada temporalmente, comenzando con los genes tempranos inmediatos en la unidad de transcripción E1A. La proteína E1A posteriormente transactiva las unidades de transcripción tempranas retardadas E1B, E2, E3, E4 y E1. El gen E1A desempeña un importante papel en el control de todos los demás RNAs

mensajeros tempranos; su producto se une al DNA modulando la transcripción. Se ha visto que esta proteína se relaciona estructuralmente con los polipeptidos oncogénicos *myc* y *myb*. La región E1A puede convertir células normales en malignas mediante la unión de la proteína E1A a proteínas como p105 K_B provocando que estas pierdan su función. Otro de los polipeptidos producidos por esta región (Ad12E1A) apaga la síntesis de moléculas MHC clase I permitiendo a las células transformadas sobrevivir en presencia de linfocitos T citotóxicos. Después de que la replicación del DNA ha comenzado, el promotor principal tardío (MLP, "major late promoter") es quien se vuelve activo y dirige la mayoría de la transcripción viral subsiguiente²⁹.

Construcción del Vector Viral. Muchos de estos vectores se construyen a partir de los serotipos humanos 2 y 5, en los cuales las regiones E1A y E1B son suprimidas para prevenir la replicación viral. Estos vectores son propagados en células 293 humanas, las cuales proveen productos genéticos *in trans*. En algunos vectores la región E3 (no esencial para la replicación del genoma viral) es eliminada proporcionando mayor espacio para el gen terapéutico. Algunos de los vectores adenovirales en uso presentan deleciones en las regiones E1A-E1B y E3 y la expresión de las secuencias insertadas es promovida usualmente ya sea por el promotor E1A, o por MLP y sus secuencias líder asociadas, o por el promotor E3 o bien por secuencias promotoras externas que han sido agregadas³⁰.

Estudios preclínicos demuestran que puede lograrse una transducción eficiente en un número significativo de células *in vivo* y que la expresión génica persiste por un período de tiempo considerable. A pesar de que la expresión de la región E1 afecta la expresión de otros productos virales necesarios para la replicación, su presencia no es absolutamente necesaria. Sin embargo, la habilidad de los genomas adenovirales carentes de esta región para replicar, depende de la expresión de productos genéticos del huésped o del estado proliferativo de las células. Esto quiere decir que la capacidad del adenovirus para replicarse *in vivo* dependerá principalmente de la naturaleza de la célula blanco³¹. La

construcción de vectores recombinantes se logra mediante la recombinación homóloga entre genomas de adenovirus modificados y un plásmido expresado, que contiene el transgen de interés flanqueado por secuencias que se identifican con el genoma del adenovirus.

Cuando hablamos de vectores de transferencia génica, los adenovirus tienen un número considerable de ventajas sobre otros métodos. Existe un amplio rango de células de mamíferos a las cuales pueden infectar. Pueden ser producidos en títulos bastante elevados del orden de 10^{12} PFU/ml, por lo cual es posible realizar una infección *in vivo*. Además, los adenovirus son capaces de infectar eficientemente células en estado latente, como neuronas y hepatocitos. El hecho de que los adenovirus generalmente no se integran al genoma de las células que infectan, descarta la posibilidad de que se presente mutagenesis por inserción. Finalmente, la estructura del genoma adenoviral y sus mecanismos de regulación para la expresión génica, han sido estudiados a profundidad, lo cual facilita su manipulación.

A estas ventajas se contraponen desventajas como una expresión génica transitoria del gen terapéutico y la inducción de una fuerte respuesta inmune contra el vector. En muchos casos, el uso de vectores adenovirales requiere de una expresión transgénica prolongada o bien la administración repetida de estos. La pérdida de su expresión transgénica parece ser común en la mayor parte de los vectores adenovirales, debido en gran parte a que estos vectores tienen una replicación defectuosa y no se integran al genoma de la célula huésped¹⁴.

Debido a que la primera generación de vectores no tiene una replicación completamente defectuosa, a pesar de la delección de E1A y E1B, cantidades pequeñas de las proteínas de la capsida son sintetizadas por las células infectadas. La consecuencia es una fuerte respuesta inmune por parte del huésped que previene una infección efectiva en las siguientes exposiciones al vector. En un esfuerzo para producir vectores menos inmunogénicos, Engelhardt y colaboradores en 1994 modificaron al vector estándar mediante la introducción de una mutación termosensible en la proteína de unión al DNA

codificada por la región E2A, previniéndose así su expresión. De esta manera, se redujo la expresión de proteínas de la capsida y, por tanto, la inducción de la respuesta inmune. Es necesario considerar también que el ciclo de vida del adenovirus implica la expresión temporal de un gran número de productos genéticos con diversas actividades biológicas. Además, esta expresión de genes permite el apagado de la síntesis proteica del huésped y la expresión de productos genéticos implicados en una transformación maligna¹⁷.

VIRUS ADENO-ASOCIADOS

Los virus adeno-asociados (VAA) se encontraron como virus satélites en preparaciones de adenovirus y posteriormente se observaron en humanos, simios y aves sin causar ninguna enfermedad aparente. Estudios subsiguientes de las infecciones latentes por VAA no han revelado alguna asociación con cáncer o algún otro efecto adverso. De hecho, se ha encontrado un efecto protector de los VAA contra carcinogénesis mediada por otros virus como adenovirus y papilomavirus²¹.

Los virus adeno-asociados pertenecen al género parvovirus, miembros de la familia *Parvoviridae*. Poseen DNA lineal de cadena sencilla, muestran una simetría cúbica y no tienen cubierta. La replicación y ensamble de la capsida se efectúa en el núcleo de la célula huésped. Son virus "defectuosos" que no pueden replicar, sino es con la ayuda de otros virus conocidos como virus cooperadores, usualmente adenovirus, herpesvirus o vaccinia. En ausencia de éstos, el genoma del VAA se integra al cromosoma del huésped y permanece latente por períodos prolongados. Su genoma está constituido por 4681 nucleótidos, incluyendo dos repetidos invertidos terminales abreviados como ITRs ("inverted terminal repeats"), los cuales contienen las secuencias que actúan en *cis* mínimas necesarias para la replicación, empaque y rescate. Las porciones palíndromicas de los ITRs pueden formar horquillas en la cadena sencilla de DNA. La horquilla 3' sirve como origen de replicación y sitio de enlace a proteínas rep. Se ha encontrado que los ITRs poseen actividad promotora

intrínseca de transcripción. Dentro de ellos existen dos marcos de lectura abiertos (ORFs "open reading frames"), que codifican para rep y cap, implicados en la replicación y la encapsidación respectivamente. El gen *rep* es transcrito a partir de 2 promotores: p_{ps} y p_{ps} generándose las proteínas rep 68, 78, 40 y 52. Las primeras dos son requeridas para la escisión y replicación del DNA viral, mientras que rep 40 y rep 52 se necesitan para la acumulación de cadenas sencillas de DNA²².

Rep 68 y rep 78 controlan la replicación del DNA de VAA, por medio de una interacción directa con los ITR's. Las proteínas rep presentan actividades *in vitro* que incluyen: la de helicasas dependientes de ATP, unión a DNA de secuencias específicas y actividad de endonucleasas específicas de cadena y secuencia²³.

El gen *cap* es transcrito a partir del promotor p_{ps} en dos formas solapadas: el transcrito menor, a partir del cual VP1 es traducido y el transcrito mayor, a partir del cual VP2 y VP3 son traducidos usando dos codones de iniciación diferentes. La proteína codificada por el gen VP3 es la más abundante en el virión. En algunas líneas celulares humanas, el provirus VAA se integró con una frecuencia de 50% a 70% en una región (sito VAASI) del cromosoma 19. En un principio se pensó que el complejo que formaba la proteína Rep con la horquilla del ITR y el sito VAASI servía como intermediario para esta integración cromosómica específica, sin embargo, se encontró que este sitio de unión para la proteína Rep está presente en varios sitios cromosómicos. Por esta razón, se piensa que la formación de este complejo no es el único responsable de la integración en el sito VAASI. Se requiere aun de estudios adicionales que nos permitan conocer todas las causas que propician la mayor frecuencia de integración al cromosoma 19²⁴.

Construcción del Vector Viral Debido a la integración estable que presenta el DNA del VAA en el genoma celular se pensó en la posibilidad de construir virus adeno-asociados recombinantes que portaran genes terapéuticos. Para ello se han utilizado plásmidos con la finalidad de evitar la generación de VAA de tipo silvestre. Este método

implica la co-transfección de líneas celulares como las células 293 con un plásmido que contiene los marcos abiertos de lectura para *rep* y *cap* bajo el control de los promotores p15, p19 y p40 y otro plásmido que contiene cDNA heterólogo con las señales apropiadas para la transcripción como: promotor, amplificador y señal de poliadenilación, flanqueadas por los ITRs de VAA²⁴. El principal atributo de este sistema es la reducción de un solapamiento de secuencias entre los plásmidos *itr*⁺ e *itr*⁻, disminuyéndose de este modo la recombinación homóloga y por consiguiente la generación de VAA de tipo silvestre²⁴.

Los vectores construidos con virus adeno-asociados han demostrado ser eficientes en su transducción y poseer la habilidad para infectar células que no se dividen. Esto trae como consecuencia que su integración al genoma celular no ocurra y que por consiguiente la expresión del vector se vea disminuida. Por otra parte, otro punto importante de estos vectores, que podría ser considerado una de sus ventajas, es la integración específica que se ha encontrado en el tipo silvestre, al cromosoma 19 en líneas inmortalizadas²⁵. Sin embargo, se sabe que este fenómeno es menos frecuente con VAA recombinantes y sobre todo que esta integración localizada no ha sido demostrada todavía después de una infección *in vivo*.

La principal limitación de los VAA para Terapia Génica es su limitado espacio para el gen terapéutico y problemas con la producción y purificación del vector. Mientras que un genoma del VAA tiene 4.7kb de longitud, un VAA recombinante pequeño sobrepasa las 5kb. Esto es porque la secuencia mínima de los ITR's es de 145 bases, dejando un espacio de 4.7kb para el gen de interés y todos los elementos de expresión necesarios como promotores, amplificadores y señales de poliadenilación. Este límite de espacio en el vector excluiría a muchos genes de gran tamaño que pudieran ser candidatos a Terapia Génica. Ahora bien, la habilidad de empacar y purificar grandes cantidades de vectores de VAA, se encuentra limitada por factores técnicos, la principal dificultad es la de mantener estables las líneas

celulares de empaque que expresan al gen *rep*. Sin embargo, esta es una limitación relativa ya que se continúa con la búsqueda de nuevos métodos para resolver este problema⁴⁵.

HERPESVIRUS

Los herpesvirus pertenecen a la familia *Herpesviridae*, son de talla mediana y contienen DNA lineal de doble cadena. Su capside presenta simetría cúbica con 162 capsómeros. Se forman en el núcleo y se rodean de una envoltura de lípidos. Adquieren la membrana de lípidos por gemación a través de la membrana nuclear⁴⁶.

Los herpesvirus son virus neurotrópicos que producen infecciones latentes en las células neuronales, de tal modo que cuando el vector de herpesvirus es introducido a la célula, se mantiene en ella durante la vida de la misma en un estado epistémico. Además de que son capaces de expresar genes exógenos incluyendo los provenientes de una gran variedad de células de mamíferos, tienen la capacidad de contener más de 30 kb de DNA y poderse obtener títulos altos de sus vectores. Por todas estas características, han sido considerados como los futuros vectores a emplearse en el sistema nervioso.

Construcción del Vector Viral Debido a la regulación tan compleja que presenta su replicación, ha sido difícil generar vectores virales recombinantes que sean completamente incapaces de replicar. Recientemente se encontró que incluso una replicación incompetente de estos virus es suficiente para matar a las células, debido a que ciertos productos genéticos virales específicos de la replicación, que se continúan expresando en las células infectadas son tóxicos para las mismas, tal es el caso del vector CgalA3 generado por la delección de casi toda la porción codificante del gen temprano inmediato IES. El producto de este gen es la principal proteína reguladora de la transcripción, la cual se requiere tanto en la expresión genética temprana como tardía⁴⁷.

celulares de empaque que expresan al gen *rep*. Sin embargo, ésta es una limitación relativa ya que se continúa con la búsqueda de nuevos métodos para resolver este problema²⁵.

HERPESVIRUS

Los herpesvirus pertenecen a la familia *Herpesviridae*, son de talla mediana y contienen DNA lineal de doble cadena. Su cápside presenta simetría cúbica con 162 capsómeros. Se forman en el núcleo y se rodean de una envoltura de lípidos. Adquieren la membrana de lípidos por gemación a través de la membrana nuclear²⁶.

Los herpesvirus son virus neurotrópicos que producen infecciones latentes en las células neuronales, de tal modo que cuando el vector de herpesvirus es introducido a la célula, se mantiene en ella durante la vida de la misma en un estado episomal. Además de que son capaces de expresar genes exógenos incluyendo los provenientes de una gran variedad de células de mamíferos, tienen la capacidad de contener más de 30 kb de DNA y poderse obtener títulos altos de sus vectores. Por todas estas características, han sido considerados como los futuros vectores a emplearse en el sistema nervioso⁹.

Construcción del Vector Viral Debido a la regulación tan compleja que presenta su replicación, ha sido difícil generar vectores virales recombinantes que sean completamente incapaces de replicar. Recientemente se encontró que incluso una replicación incompetente de estos virus es suficiente para matar a las células, debido a que ciertos productos genéticos virales específicos de la replicación, que se continúan expresando en las células infectadas son tóxicos para las mismas, tal es el caso del vector CgalΔ3 generado por la delección de casi toda la porción codificante del gen temprano inmediata IE3. El producto de este gen es la principal proteína reguladora de la transcripción, la cual se requiere tanto en la expresión genética temprana como tardía²⁷.

De una manera general, se puede decir que de acuerdo a su construcción hay dos tipos de vectores de HSV-1 ("herpes simplex virus type 1"): virus cooperadores dependientes de sistemas de vectores de plásmidos y vectores basados en genomas virales recombinantes. Los primeros contienen secuencias específicas de HSV para la replicación y empaque en presencia de virus cooperadores, este tipo de vectores han sido utilizados para transferir el gen *lacZ* a cultivos de neuronas. En teoría, si la célula es infectada con un vector de plásmido en ausencia de un virus cooperador, no debe sufrir ningún efecto citopático, por ello es importante que la razón de vector de plásmido y virus cooperador sea elevada. El segundo, que es el caso del vector recombinante, se utilizó para transferir el mismo gen *in vivo* a un cerebro de mamífero observándose solo una expresión transitoria²⁷.

La expresión no regulada de los 4 genes restantes en estos vectores producen muerte celular, los mecanismos mediante los cuales se regularía negativamente la expresión génica de HSV-1 evitando el ciclo lítico o la muerte celular durante la latencia son mediados probablemente por una combinación de factores celulares y virales que aún se desconocen, por lo cual se necesita más investigación al respecto para lograr desarrollar vectores de HSV-1 seguros y eficientes para la transferencia génica²⁷.

Como podemos observar, existen varios sistemas virales que se han desarrollado para la transferencia génica aunque, no todos han avanzado de igual manera que los sistemas retro y adenovirales. Por ejemplo, los virus adeno-asociados se encuentran limitados por su reducida capacidad para la introducción a su genoma del gen terapéutico. Sin embargo, su aparente habilidad para integrarse a un sitio particular del genoma humano es de gran significado, si el vector recombinante la manifiesta tanto *in vivo* como *in vitro*.

Por su parte, los herpesvirus también parecen ser prometedores como vectores de transferencia génica por su tropismo a tejidos neuronales. Sin embargo, su genoma grande y complejo requiere todavía de un mayor entendimiento para poder ser considerados vectores de transferencia génica eficientes y seguros dentro de estos sistemas.

TÉCNICAS NO VIRALES

A pesar de que la mayor parte de las investigaciones se han enfocado al uso de virus recombinantes para la transferencia genética, también ha habido un considerable progreso en el desarrollo de técnicas no virales, llamadas también formulaciones farmacéuticas de genes o virus artificiales (por emular funciones biológicas de los virus). De hecho, se ha esperado que la transferencia genética pueda extender su potencial terapéutico a muchos productos biológicos convencionales que comúnmente no son lo suficientemente efectivos por sí solos y, sobre todo, competir contra las terapias quirúrgicas y farmacéuticas convencionales por su aceptación en el mercado ofreciendo una mayor efectividad, seguridad y un costo razonable. Para lograrlo, necesita ser similar a la terapéutica convencional en su naturaleza y modo de administración¹².

El avance en los sistemas de envío de fármacos representa una importante base experimental y teórica para el desarrollo de terapias genéticas no virales. Muchos métodos para el envío genético no viral, incluyendo el uso de liposomas, lípidos catiónicos, polímeros y péptidos de lisis endosomal, fueron desarrollados a partir del envío controlado de fármacos convencionales y productos biológicos. La distribución de una partícula en el organismo depende de sus propiedades físicas como: tamaño, carga, características de superficie, interacción con proteínas sericas y con superficies celulares. Por ejemplo, debido a su tamaño, es poco probable que el DNA difunda una distancia considerable a partir del sitio de inyección intersticial o que atraviese eficientemente barreras como endotelio, epitelio queratinizado o barrera hematoencefálica. Similarmente, debido a su carga y propiedades de superficie, es posible que el DNA introducido en espacios vasculares sea opsonizado y eliminado por células reticuloendoteliales. Debido a esto, la transferencia genética se inició en tejidos accesibles a la administración intersticial como músculo, tumores sólidos, piel y epitelio pulmonar, así como tejidos accesibles al compartimento vascular como endotelio pulmonar y hepatocitos¹³.

Las teorías y métodos desarrollados para controlar el envío de fármacos de tamaño molecular pequeño, usando acarreadores específicos han resultado ser útiles para el envío de genes a las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas formulaciones incluyen la incorporación de lípidos, péptidos y polímeros así como ligandos para receptores celulares específicos y tráfico intracelular. Estos métodos requieren ser adaptados al tamaño y carga del DNA además de asegurar su llegada al núcleo.

SISTEMAS DE TRANSFERENCIA *in vitro*

Los modelos *in vitro* han demostrado ser poco fieles a su funcionamiento *in vivo*, sin embargo han sido importantes en el entendimiento y desarrollo del proceso de entrada y expresión del gen y han permitido llevar a cabo las primeras validaciones de los sistemas de transferencia genética que están siendo empleados en modelos animales y ensayos clínicos.

Transfección Uno de los primeros métodos empleados para la transferencia del DNA a las células fue la precipitación de DNA con $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ y posterior aplicación a células en monocapa. Su mecanismo no ha sido caracterizado con detalle, pero se piensa que el complejo Ca-DNA forma una partícula que precipita en la superficie del cultivo celular permitiendo la entrada por medio de una endocitosis no específica¹². La eficiencia de la transfección dependerá de la calidad de la reacción de precipitación y el tamaño del precipitado formado. Una de las variaciones realizadas a este método de transfección fue la utilización de otros cationes como DEAE, polilisina y polibreno¹³. La transfección con estos métodos permitió la entrada del DNA en un 10-50% de las células cultivadas. Mucho del DNA introducido no se integró en los cromosomas celulares, pero permaneció en el núcleo como un elemento extracromosomal o episoma. La frecuencia con la que se integraron los plásmidos transfectados fue baja (10^{-4} a 10^{-5} células) y esta integración ocurrió en posiciones al azar¹⁴.

Métodos Físicos La microinyección de DNA al núcleo ha sido uno de los métodos físicos que ha permitido la expresión de genes recombinantes con una integración poco frecuente. A pesar de que el número de células transfectadas es limitado, ha sido usado para la introducción de genes en embriones utilizados en la producción de animales transgénicos y ha tenido una menor aplicación en Terapia Génica somática⁹⁰.

El bombardeo de micropartículas unidas a DNA representa un método análogo al método de inyección directa, solo que implica la precipitación del DNA sobre las micropartículas, las cuales son incorporadas hasta el interior de las células mediante un dispositivo que impulsa las partículas mediante la expansión de un gas ("gas driven ballistic devices")⁹¹. Una vez que las partículas cubiertas con DNA se depositan dentro de la célula, el DNA es removido gradualmente de la partícula permitiendo la expresión génica. Este método ha sido empleado tanto en la ingeniería genética de plantas, así como para la expresión transitoria de ciertos genes en una gran variedad de tipos celulares incluyendo líneas celulares humanas de origen epitelial, endotelial, fibroblástico y linfocitario y en células primarias como linfocitos, monocitos y fibroblastos. La integración de DNA por medio del bombardeo con partículas ocurre en un grupo de 10^4 a 10^7 células⁹².

Otro de los métodos físicos ampliamente utilizado es la electroporación, en la cual las células son expuestas a un voltaje elevado, lo cual modifica la permeabilidad de sus membranas permitiendo el paso del DNA a su interior. Las condiciones para la electroporación como son el voltaje y la capacitancia deben ser ajustadas para cada tipo celular para lograr una eficiencia de transfección óptima y un alto porcentaje de viabilidad celular. Por medio de este método se alcanza una transfección transitoria de más de 90% de las células en muchas de las líneas celulares y algunas de las células primarias probadas⁹³.

Lípidos Catiónicos y Liposomas Los lípidos catiónicos se han convertido en agentes importantes para la transferencia genética *in vitro*. El prototipo utilizado es DOTMA (1,2-dioleiloxipropil-3-trimetil bromuro de amonio)⁹⁴. Las formulaciones

elaboradas de DNA con lípidos catiónicos como DOTMA y fosfolípidos neutros como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) (fig. 2.3) producen complejos lipido-DNA capaces de introducir eficientemente el DNA en las células. Estos métodos dan eficiencias de transfección mayores a 90% en algunas líneas celulares y células primarias. Comercialmente las mezclas de lípidos catiónicos (lipofectina, lipofectamina y otras) se encuentran disponibles solo para investigación. El complejo lipido-DNA de estas formulaciones no es un liposoma verdadero, en el cual los componentes se encuentran encapsulados dentro de una estructura lipídica; sino que el lípido catiónico forma una partícula mediante la condensación del DNA por interacciones iónicas entre ambos. De hecho, este complejo puede contener varios plásmidos a través de interacciones hidrofóbicas entre los enlaces lipídicos. El tamaño y la carga del complejo lipido-DNA y su eficiencia en la transferencia génica pueden ser optimizados alterando la composición de los lípidos y del DNA dentro del complejo. Por ejemplo, vesículas grandes multilaminares de 300-700nm pueden ser más efectivas que vesículas unilaminares de 50-100nm⁴⁴. Se han sintetizado una gran variedad de estos lípidos catiónicos incluyendo estructuras análogas a DOTMA como DMRIE (1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethyl bromuro de amonio) y DCTAP (1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano) (fig. 2.3) así como lípidos que contienen polilisina, colesterol, lipopoliámidas y detergentes de amonio cuaternarios. Lípidos neutros como el monoolecicérido (MOG) y colesterol, han sido empleados en lugar de DOPE. A pesar de que varios de estos lípidos catiónicos y sus combinaciones exhiben distintas eficiencias en la transferencia génica a diversos tipos celulares, no existen todavía patrones claramente establecidos concernientes a los acarreadores lipídicos necesarios para optimizar estos métodos.

Los liposomas convencionales también han sido investigados como acarreadores para la transferencia génica. Estudios comparativos demuestran que son menos efectivos que los lípidos catiónicos y otros sistemas *in vitro* de acarreo. Para mejorar su eficiencia se han

creado los "vírosonas", que son liposomas con proteínas virales como la hemaglutinina del virus Sendai¹³. Se cree que estos complejos se unen a receptores de superficie de la célula blanco e introducen el DNA en el citoplasma por una fusión mediada por la hemaglutinina. Se ha demostrado que la eficiencia de los liposomas puede ser incrementada mediante el uso de proteínas nucleares encapsuladas junto con el plásmido de DNA dentro del liposoma¹⁴. Se piensa que la presencia de proteínas nucleares incrementa el tráfico del DNA hacia el núcleo debido a señales que dirigen al núcleo y que están presentes en este tipo de proteínas¹⁵.

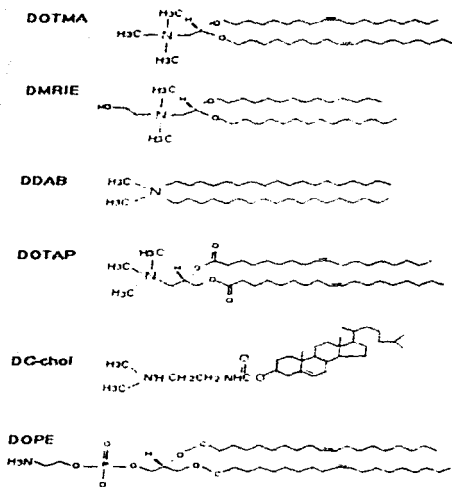


FIG. 2.3

ESTRUCTURAS DE LÍPIDOS USADAS EN TERAPIA GÉNICA NO VIRAL^{1,2}

DOTMA: 1,2-dioleoilpropil-3-trimetil bromuro de amonio, DMRIE: dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethyl bromuro de amonio, DDAB: dimiristil, tadecil bromuro de amonio
 DOTAP: 1,2-dioleoil-3-(trimetilamoni)propil, DC-cholesterol: 3-[N-(N'-dimetilamino)octano] carbamato] colesterol, DOPE: dioleoilfosfatidiletanolamina.

Polímeros Se ha descrito un método en el cual se emplea un polímero catiónico para la transferencia genética. En este método se utiliza un dendrímero que es un polímero catiónico de poliamidamina en cascada con un carga positiva uniforme y un diámetro determinado por el número de pasos de la síntesis. Los complejos dendrímero-DNA se construyen empleando dendrímeros de diferentes tamaños y diferentes radios de carga (un dendrímero catiónico a un DNA aniónico). Estos sistemas presentan una transferencia genética eficiente en un rango amplio de tipos celulares¹².

Así como otros sistemas emplean acarreadores catiónicos, el complejo dendrímero-DNA se cree que entra a las células mediante endocitosis inducida por una atracción iónica entre la carga neta positiva del complejo y la carga negativa de la superficie celular. Se ha logrado mejorar su eficiencia mediante la adición de péptidos que favorecen la remoción del contenido endosomal dentro del cuerpo de la célula.

Transfección Mediada por Ligandos Otro método para la introducción de genes a las células es el acoplamiento del DNA a ligandos capaces de unirse a la superficie de las células blanco. Estos complejos se obtienen por unión covalente del ligando a la polilisina que posteriormente forman el complejo ligando-polilisina-DNA por interacción iónica (polilisina con carga positiva y DNA con carga negativa)¹³. Otra alternativa, es asociar covalentemente los ligandos a agentes intercalantes como la bis-acridina o dímeros de etidio que posteriormente se intercalan en el DNA mediante enlaces no covalentes. De este modo los complejos conservan su habilidad para interactuar específicamente con receptores conocidos de la célula blanco, permitiendo así un internamiento del complejo mediada por receptores¹⁴.

El estudio de diversos ligandos ha tenido buen resultado ya que se ha encontrado cierta especificidad en algunos de ellos para determinado tipo de células, como por ejemplo: el complejo transferrina-polilisina-DNA es efectivo en la transferencia genética a células

hematopoyéticas y epitelio pulmonar¹⁶; los complejos de asialo-orosomucoide-polilisina-DNA funcionan para la transferencia y expresión de genes en hepatocitos y células de hepatoma¹⁷; los complejos de surfactante β -polilisina-DNA o anti-trombomodulina-polilisina-DNA son efectivos en la transferencia génica a células epiteliales de vías respiratorias¹⁸. También se han utilizado ligandos de moléculas pequeñas como residuos de tria-galactosilo y folato¹⁹.

Potenciación de la Remoción Endosomal La mayoría de los métodos de transferencia génica *in vitro* mencionados implican la entrada del DNA a la célula mediante endocitosis. Uno de los factores que disminuye la eficiencia de estos métodos es la degradación que sufre el DNA una vez dentro del endosoma. Por esto se ha tratado de encontrar la forma de remover el DNA del endosoma antes de que el lisosoma se una a este último acidificándolo y permitiendo la entrada de la endonucleasa que digiere rápidamente al DNA. Uno de los intentos ha sido agregar partículas adenovirales a la mezcla de transfección basándose en la observación de que cuando estos virus infectan a la célula, son capaces de inducir lisis endosomal²⁰. Esta lisis es mediada por una proteína pentamérica que se encuentra en la superficie del virus, la cual modifica su estructura, convirtiéndose en ternaria con la acidificación del endosoma. Este cambio estructural le permite penetrar la membrana endosomal promoviendo la remoción de su contenido. La adición de 10^9 partículas adenovirales/ml junto con complejos de transferrina-polilisina-DNA²¹, asialoglicoproteína-polilisina-DNA²² o folato-polilisina-DNA mostraron una eficiencia de 100 a 1000 veces mayor, por lo que este método se ha convertido en la marca a superar para los nuevos métodos de transferencia génica.

El adenovirus más comúnmente empleado es el adenovirus humano tipo 5, o bien variantes de este virus defectuosas en su replicación. También se ha visto que es posible utilizar el adenovirus del pollo, el cual presenta una replicación defectuosa, por naturaleza, en el hombre. La polilisina se une a la partícula adenoviral covalentemente permitiendo su unión

al DNA mediante atracción iónica. Alternativamente, la superficie del adenovirus puede ser biotinilada y el DNA formar parte del complejo estreptoavidina-polilisina¹⁷.

El hecho de que estos complejos sean capaces de transferir genes a la célula eficientemente, sin la ayuda de un ligando adicional que dirija el complejo a la célula blanco, sugiere que el adenovirus no solo cumple la función de potenciar la remoción del endosoma, sino que también estimula la endocitosis a través de su interacción con receptores celulares. Y esto se confirma cuando por una excesiva modificación covalente con polilisina de la superficie del adenovirus, la eficiencia de transferencia genética se ve disminuida, probablemente por la alteración de ciertos determinantes del virus necesarios para la interacción con el receptor celular¹⁸.

Se han intentado otros métodos para potenciar la remoción endosomal sin tener que utilizar partículas adenovirales. Uno de ellos se enfocó a la identificación y aislamiento de los dominios proteicos que exhiben propiedades análogas a la partícula adenoviral completa, sin embargo, hasta ahora no ha tenido éxito. Otro de ellos implica el uso de péptidos de hemaglutininas de varios patógenos como el virus de la influenza. Estas últimas, como la proteína pentamérica del adenovirus, en medios ácidos, presentan una actividad de aglutinación en la membrana. Los resultados con esta hemaglutinina dentro del complejo han sido mejores que los obtenidos con transferrina, pero no han llegado a ser tan buenos como los obtenidos con la partícula viral¹⁹. En otros métodos se utiliza un péptido sintético diseñado con una estructura similar a la proteína viral²⁰. Este, acoplado a acarreadores poliméricos, ha incrementado de 10 a 100 veces la eficiencia de la transferencia genética. Y finalmente uno de los últimos métodos ha hecho uso de fármacos como cloroquina o colchicina para interrumpir el proceso de acidificación del endosoma y la fusión con el lisosoma²¹.

SISTEMAS DE TRANSFERENCIA *in vivo*

La inyección de DNA viral purificado en animales de experimentación *in vivo* ha inducido la infección viral y respuesta inmunológica contra proteínas virales¹³. Por ello se descarta la posibilidad del uso de DNA *in vivo* para la Terapia Génica. Sin embargo, la observación de que ciertas células eran capaces de tomar y expresar DNA, así como la posibilidad de potenciar la transferencia genética basándose en los principios del envío de fármacos dieron paso al desarrollo de estrategias de transferencia genética *in vivo*.

Administración de DNA Purificado El primer resultado importante para este sistema de transferencia fue la observación de que la inyección de DNA recombinante purificado o de precipitados de DNA en músculos esquelético y cardíaco, permitía su entrada y expresión en varias especies incluyendo ratas, ratones, conejos y mandriles¹⁴ aunque la expresión resulte ser baja. A pesar de esto, la inyección intramuscular de DNA "libre" ha sido utilizada con éxito para expresar antígenos virales y establecer respuestas inmunes celulares y humorales. Esto nos sugiere la posibilidad de crear vacunas genéticas a partir de una simple administración intramuscular de DNA¹⁵.

La inyección intramuscular de DNA "libre" también ha sido utilizada para introducir el gen de la distrofina en músculos de modelos animales con distrofia muscular, produciéndose una expresión prolongada de la distrofina en un número limitado de fibras musculares y la protección de estas fibras a la degeneración. Otro de los tejidos que ha respondido bien a la inyección de DNA "libre" es el de la tiroidea, donde una inyección intersticial de DNA permite la entrada y expresión del DNA en las células foliculares de tiroidea. Similarmente, la inyección de DNA a fluido sinovial permite la entrada y expresión de DNA en células sinoviales tipo A¹⁶.

Recientemente, se observó que con una inyección de grandes cantidades de DNA en el hígado (2-5mg) se detecta la expresión de genes recombinantes. Por otra parte, la inyección

epidérmica de DNA produce una expresión baja y una respuesta inmunológica contra el producto génico codificado⁴⁷.

Estos resultados sugieren que la ausencia de patrones de dosificación de DNA para cada tejido reflejan grandes diferencias en la eficiencia de entrada y expresión del gen. El mecanismo mediante el cual las células permiten la entrada y expresión del gen, aún se desconoce. Se ha propuesto que en el músculo, el DNA es llevado a través de los túbulos T al interior de la célula. En tirones y cavidad sinovial se piensa que el DNA es introducido pasivamente mediante endocitosis. La eficiencia de la transferencia génica y expresión, después de una administración directa de DNA purificado en cualquiera de estos sistemas es baja, sin embargo, la inyección directa en músculo puede ser útil en la vacunación y secreción de ciertas proteínas a la circulación⁴⁸.

Potenciación de la entrada de DNA Los estudios iniciales que se hicieron, compararon el nivel de expresión que se presentaba cuando se administraba DNA en solución salina y cuando se administraban precipitados de DNA. Esta última administración presentó una expresión mayor. Por otra parte, se logró incrementar la expresión mediante una preinyección muscular de sacarosa hipertónica, lupivictina o de la cardiotoxina del veneno de la serpiente *Naja naja*. Esto debido a que las miotoxinas causan daño muscular en el sitio de la inyección permitiendo la proliferación de células inmaduras musculares que son más susceptibles a la transferencia génica⁴⁹.

Curiosamente, ningún sistema mediado por receptores, lípidos catiónicos o polímeros estudiado hasta la fecha, parecía ser efectivo en la potenciación de la entrada de DNA a músculo, de hecho, muchos de estos acarreadores parecían inhibirla. Recientemente una nueva formulación de polímero logró potenciar la transferencia génica a músculo después de su administración intramuscular. Esta formulación fue diseñada en base a los principios utilizados para potenciar el envío de fármacos convencionales. Los estudios realizados demuestran un incremento 10 veces mayor de la expresión de varios genes como: el factor

IX, el factor de crecimiento de insulina tipo I y la hormona de crecimiento, sin ninguna toxicidad aparente en el músculo¹².

Otro método para la introducción de DNA purificado *in vivo* es el bombardeo de micropartículas cubiertas con DNA proyectadas a los tejidos utilizando una "pistola genica". Esta ha sido empleada para transferir genes en varios órganos *in vivo* incluyendo piel, hígado y músculo¹³. Este método se emplea para expresar antígenos para vacunación en sistemas experimentales. Sin embargo, la pistola genica no es capaz de penetrar profundamente en tejidos por lo que solo es eficiente su envío en capas superficiales del tejido inyectado¹⁴.

También se demostró que el DNA puede ser administrado a tejidos por medio de la inyección "jet" (surtidora) o el recurso de inyección "libre de aguja". La inyección "jet" se refiere a la proyección de gotas muy pequeñas de líquido dentro de los tejidos por medio de presión. Este método ha sido utilizado en la clínica para administrar distintos fármacos y productos biológicos con propósitos terapéuticos o de vacunación. La inyección "jet" del DNA en músculo permite la entrada y expresión del gen administrado¹⁵.

Lípidos Catiónicos El pulmón parece ser el tejido más susceptible a la transferencia mediada por lípidos catiónicos. Estos han sido utilizados en varias especies, como ratones, ratas y ovejas, empleándose como vía de administración la intravenosa. En uno de los experimentos realizados se logró la expresión de α_1 -antitripsina y del regulador transmembranal de conductancia de la fibrosis quística (CFTR) en pulmones de animales de experimentación. Otros estudios demostraron que el envío de genes que codifican para prostaglandín G/H sintetasa protegen a los pulmones de conejo contra una inflamación inducida por endotoxinas e hipertensión pulmonar. Los productos genéticos secretados han sido identificados también en la circulación sistémica después de la administración intravenosa de los complejos lipido catiónico-DNA. Una administración intratraqueal de

estos complejos permite la fabricación de productos genéticos por varias capas de células epiteliales de los bronquios¹².

La expresión genética, después de una administración intravenosa de los complejos, ha sido demostrada en endotelio y otros tejidos pulmonares. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual estos complejos se dirigen específicamente a pulmón, aún se desconoce. Por otra parte, aunque se sabe que partículas con un diámetro mayor a 2μ se depositan en las camas capilares del pulmón, la presencia de agregados de complejos con un diámetro de 100-200 nm en sangre, puede ser explicada mediante el mecanismo de clarificación de "primer paso" que se basa en las interacciones iónicas o hidrofóbicas que se dan entre la partícula y el endotelio capilar¹³.

En estudios sobre cáncer se administraron complejos lipídicos catiónicos-DNA directamente a tumores, expresándose en las células tumorales antígenos que potenciaban la inmunogenicidad del tumor o la expresión de antígenos tumor-específicos¹⁴. Un intento clínico fue el que empleó al gen que codifica para HLA B7 introducido en melanomas como xenocáncer con la idea de que la respuesta inmunológica contra este antígeno así como la presentación incrementada de antígenos tumor específicos propiciarán una destrucción mediada inmunológicamente. Estudios en 5 pacientes demostraron la entrada y expresión del plásmido en tumores y una respuesta parcial en contra del tumor¹⁵.

Los lipídicos catiónicos han sido utilizados también para introducir genes en células endoteliales. En estos estudios el DNA es administrado directamente a las células usando catéteres de balón que ocluyen el flujo arterial e instilan los complejos en el vaso. Este método ha sido usado para estudiar el efecto de varios factores de crecimiento, así como para establecer un modelo animal de arteritis mediante la expresión de HLA-B7¹⁶. Finalmente también se ha demostrado transferencia genética a linfocitos T esplénicos después de inyección intraperitoneal¹⁷.

Otros Liposomas Los liposomas son empleados para transferencia génica a hígado. Se ha logrado la entrada y expresión de genes que codifican para proinsulina preferencialmente en células de Kupffer. En estudios con virosomas unidos a proteínas nucleares se ha encontrado que la transferencia génica resulta ser efectiva en hepatocitos después de una administración directa del complejo a hígado. Lo mismo se encontró con la administración del complejo a la arteria renal (para riñón).

Microcápsulas Se ha estudiado la posibilidad de emplear células acarreadoras que expresen genes exógenos a través de microcápsulas porosas no antígenicas, permitiendo este el uso de líneas celulares de un "donador universal".

Transferencia Génica Mediada por Ligando Los complejos asialo-orosomucoide-polisina-DNA se utilizaron para lograr una expresión hepática de genes en animales normales, receptor de LDL (lipoproteínas de baja densidad) en conejos deficientes de LDL, albumina en ratas analbuminémicas y la mutasa metilmalonil CoA en ratones. Esta transferencia génica a hepatocitos ha podido ser confirmada con el uso de promotores específicos de hepatocitos, que promueven la expresión de los genes recombinantes *in vivo*⁵⁷.

CINÉTICA DE LA TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN GÉNICA NO VIRAL

A pesar de que se sabe que un plásmido con DNA se integra al genoma celular con una frecuencia baja después de una transfección *in vitro*, su integración o replicación no ha podido ser observada *in vivo*. Sin embargo, después de la administración del DNA se piensa que éste permanece en el núcleo en forma extracromosomal, pudiendo ser transcrito y traducido. En todos los sistemas *in vivo*, estudiados hasta la fecha, el DNA es gradualmente eliminado de la célula blanco provocando una disminución en la expresión del producto génico¹².

La Terapia Génica no viral tiene un periodo finito de expresión y puede ser aplicada en el tratamiento de enfermedades crónicas y agudas, modificando la dosis y frecuencia de administración. Este punto de la Terapia Génica no viral, difiere completamente de otras estrategias de Terapia Génica en donde los genes se integran al genoma de su célula blanco para expresarse indefinidamente. Es por esto, que para llevar a cabo una Terapia Génica efectiva con sistemas no virales, es necesario conocer detalladamente al gen administrado, su producto y la cinética del complejo de transferencia genica. Para ello se han iniciado los primeros estudios farmacocinéticos con la finalidad de conocer el destino que tendrán el gen y su producto después de la administración intravenosa de complejos asialoglicoproteína-polilisina-DNA o lípidos catiónicos, así como una inyección directa de DNA al músculo y fluido sinovial. En cada sistema, el DNA es rápidamente eliminado del compartimento dentro del cual es administrado, como resultado de su degradación y distribución²⁶.

Los estudios realizados con los complejos de asialoglicoproteína-polilisina-DNA administrados por vía intravenosa, demostraron que el DNA era removido del espacio vascular siguiendo una cinética de primer orden con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 2.5min. Además, en el caso de complejos lípido catiónico-DNA administrados por la misma vía, presentaron una remoción similar (rápida) del DNA administrado a circulación y una distribución amplia en diferentes tejidos en cuestión de minutos¹².

Los patrones cinéticos que se han encontrado para la inyección directa de DNA, son distintos dependiendo del tejido. En músculo, se ha encontrado producto genético después de 19 meses de la inyección, sin evidencia alguna de que el plásmido se haya integrado en la célula del mamífero²⁷. Una inyección directa de DNA con el gen que codifica CAT (cloranfenicol acetil transferasa) en la tiroides permite la entrada del gen a las células foliculotiroideas. La eliminación del DNA por la glándula sigue un proceso de primer orden con un $t_{1/2}$ de 10 hr. Sin embargo la actividad de la enzima CAT es máxima en 24 hr y va disminuyendo con un $t_{1/2}$ de 40 hr. La administración intra-articular de un plásmido de DNA a tejido sinovial,

sigue un patrón similar al anterior; por lo que se propone que ambos genes siguen un camino similar en su entrada y eliminación¹².

En el caso de pulmón, una administración intravenosa de lípidos catiónicos produce una expresión génica que persiste de 7 a 21 días⁶⁴, no obstante, existe un reporte en donde se emplean métodos análogos y se produce una expresión génica en pulmón por más de 120 días⁶¹.

La transferencia génica a hígado empleando complejos de asialoorosomucoide-polilisina-DNA presenta una rápida eliminación del DNA siguiendo una cinética de primer orden y un $t_{1/2}$ de 1 a 3 horas. A pesar de esto, los productos génicos se detectan durante 1 a 5 días después de la administración⁵⁶. Esta persistencia tan variable de los productos génicos refleja las distintas vidas medias de cada producto, más que una persistencia diferente del DNA en sí. La permanencia de los genes en hígado puede ser incrementada en 66% mediante una hepatectomía previa a la administración del complejo de transferencia génica⁶². Incluso se ha demostrado que con este método un plásmido de DNA puede permanecer en la membrana plasmática (representando vesículas citoplasmáticas) por más de 7 días⁶³.

Una reducción en el tamaño del complejo nos permite también tener una expresión génica más duradera, como lo demuestra el experimento realizado con polilisina galactosilada, en la cual su diámetro fue reducido a menos de 20nm, obteniéndose una expresión génica en hígado por más de 20 días⁶⁴.

Se ha diseñado un modelo por computadora de los eventos intracelulares que afectan la farmacocinética de la Terapia Génica¹². Este modelo numérico describe la entrada y expresión de DNA en respuesta a varios parámetros cinéticos como serían:

- La eficiencia de entrada del DNA a las células
- La compartimentalización del DNA dentro de compartimentos nucleares, citoplasmáticos o endosomales de la célula

- La tasa de degradación del DNA dentro de la célula
- La tasa de transcripción de DNA a RNA
- La estabilidad del mRNA
- La tasa de traducción de mRNA para elaborar el producto génico y,
- La compartimentalización intracelular y secreción del producto génico.

Este modelo demuestra que el tiempo de acción y la vida media de la expresión génica depende de las vidas medias intrínsecas del DNA, RNA y producto génico, en varios compartimientos intra y extracelulares, así como de las tasas de entrada, transcripción y traducción.

SEGURIDAD DE LOS SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA NO VIRALES

Los estudios realizados para estos sistemas sugieren que presentan toxicidad y perfiles de seguridad comparables a los fármacos convencionales. No existe ningún reporte de una toxicidad significativa de un DNA libre. Tampoco existe evidencia de la formación de anticuerpos contra DNA después de repetidas administraciones, o de anticuerpos antinucleares en ratón o humanos, empleando cualquiera de los sistemas descritos, incluyendo DNA libre, lípidos catiónicos o complejos con proteínas³⁵.

Los primeros reportes de estudios con complejos lípido catiónico-DNA revelaron cierta toxicidad. Los lípidos catiónicos purificados presentaban toxicidad *in vitro* como hemólisis. Sin embargo, los estudios *in vivo* no revelaron una toxicidad significativa de los complejos lípido catiónico-DNA incluyendo DOTMA, DC-chel o DMRIE. Solo se presentaron alteraciones menores en proteínas séricas después de una administración repetida de DMRIE-DOPE DNA, la cual desaparece rápidamente. Los complejos de asialoglicoproteína-polilisina-DNA han sido bien tolerados dosis únicas en estudios terapéuticos con modelos

animales. En ratón, se presentó la formación de anticuerpos después de administraciones repetidas de los mismos¹².

OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA NO VIRAL

Los esfuerzos realizados para mejorar la eficiencia de la transferencia génica no viral están siendo enfocados al entendimiento de los factores biológicos que afectan el destino y función del DNA *in vivo*. Existe poca concordancia entre la efectividad de transfección en líneas celulares *in vitro* y su efectividad de transferencia génica *in vivo*. Muchas formulaciones que son efectivas *in vitro* no lo son *in vivo* y viceversa. Los estudios de sistemas de transferencia génica se vuelven más complejos debido a que la fisicoquímica de la superficie celular, los receptores de membrana y la tendencia a endocitosis puede llegar a ser muy diferente *in vivo*, porque la célula se encuentra rodeada de una matriz intersticial, polarizada e incluso acoplada a células adyacentes¹³.

Son varios los puntos biológicos importantes para una buena transferencia génica. Uno de ellos es la biodisponibilidad del gen, la cual está gobernada por el tamaño y carga del DNA. Un plásmido en solución tiene un diámetro mayor a 100nm y muchos de los complejos que forma el DNA con lípidos y proteína son significativamente grandes. Por otra parte, la permeabilidad de la barrera endotelial está estrechamente relacionada con moléculas como la albumina, la cual es incapaz de pasar del espacio vascular al intersticial¹⁴.

La biodisponibilidad del DNA también está determinada por el patrón circulatorio. Por ejemplo, el pulmón es la primer cama capilar que será encontrada por las partículas inyectadas en vasos periféricos, por lo que el complejo administrado será atrapado en el pulmón antes de alcanzar otros órganos. Otro factor importante que afecta la transferencia génica *in vivo* es la rápida eliminación del DNA del compartimento intravascular o intersticial, después de la administración. Esto refleja la distribución a otros compartimentos biológicos. El DNA administrado directamente a tejidos es rápidamente eliminado por

degradación pocos minutos después. También es rápidamente eliminado cuando se administra intravenosamente por la acción de nucleasas que lo digieren en la célula y el trabajo que llevan a cabo células reticuloendoteliales de hígado y bazo¹².

Un factor más, es que las propiedades fisicoquímicas del complejo administrado pueden cambiar por la presencia de sales fisiológicas, proteínas, lípidos o carbohidratos, o bien por interacción con opsoninas o enzimas presentes en el espacio intersticial o vascular. Estos factores causan agregación, disociación e incluso reorganización del complejo de DNA, limitando la biodisponibilidad del material administrado y alterando su composición, de modo que ya no posee las propiedades necesarias para su transferencia a las células.

La eficiencia de la transferencia genética *in vivo* está determinada por las características fisiológicas y fisicoquímicas de la célula blanco, así como por la biología molecular de los receptores de membrana y los eventos de tráfico intracelular. Cada célula somática presenta propiedades diferentes, por lo que la causa de eliminación en la transferencia genética también se espera que sea distinta. No es posible que un método resulte ser efectivo para todos los órganos. De hecho se requiere de varias formulaciones para la transferencia de DNA a blancos específicos, basadas en las propiedades biológicas de sus células blanco¹³.

PAPEL CLÍNICO DE LA TERAPIA GÉNICA NO VIRAL

No ha sido posible con los sistemas no virales desarrollados hasta la fecha, igualar la eficiencia de transferencia y los altos niveles de expresión de ciertos métodos virales, sin embargo, la terapia genética no viral ha permitido la expresión finita de productos genéticos en ciertos tejidos con un alto grado de seguridad¹⁴.

Los órganos atractivos para esta terapia son pulmón, hígado, endotelio y tejidos accesibles a la inyección intersticial directa como músculo, piel o masas tumorales. Entre estos ejemplos, muchos de ellos han presentado una expresión suficiente en modelos animales lo que

sugiere la efectividad de esta en humanos. Entre estos se incluyen la expresión de antígenos virales en el músculo para vacunación, la expresión de haloantígenos y citoquinas en tumores para terapia contra cáncer, la expresión de la prostaglandina sintetasa para prevenir hipertensión pulmonar y la expresión de metil malonil CoA mutasa en el hígado para tratar la acidemia metilmalonica¹.

El último reto para la Terapia Génica es desarrollar productos que puedan ser usados como los productos farmacéuticos convencionales, compitiendo por la aceptación de pacientes y médicos con las terapias actuales, ofreciendo una mayor seguridad, eficiencia satisfacción y un menor costo. Su promesa es crear medicamentos basados en la genética que sean desarrollados, distribuidos, prescritos y administrados como la medicina convencional para enfermedades comunes, exhibiendo perfiles de seguridad y eficacia similares a los de los fármacos convencionales y productos biológicos.

La investigación en Terapia Génica se ha enfocado a una gran variedad de enfermedades, la mayoría de ellas se deben a desórdenes de tipo recesivo y pueden ser corregidas mediante la adición del gen funcional a las células apropiadas. Sin embargo, la Terapia Génica puede ser empleada también en el tratamiento de enfermedades adquiridas, como es el caso de cáncer y enfermedades infecciosas. En casos como deficiencias de algún factor de coagulación, casi cualquier célula somática puede ser blanco de la Terapia Génica porque el producto genético requiere ser secretado sistemáticamente. En otros casos el gen debe ser enviado a cierto tipo de células como por ejemplo, los hepatocitos para el caso de la deficiencia de la ermitina transcarrbamilasa, enzima que interviene en el ciclo de la urea¹.

Para poder establecer las enfermedades que son candidatas a ser tratadas mediante Terapia Génica, es necesario conocer los tejidos blanco que se logran alcanzar mediante la transferencia genética, así como también cuales son las estrategias que puede seguir este tipo de terapia.

TEJIDOS BLANCO

El sistema hematopoyético es uno de los principales blancos para Terapia Génica debido a que ya han sido desarrollados procedimientos para el trasplante de médula ósea, además de que existen diversos tipos de estas células con una amplia distribución, y varias enfermedades que las afectan. De hecho, las terapias basadas en la transferencia de células hematopoyéticas modificadas genéticamente, son aplicables a desórdenes como hemoglobinopatías, SIDA y cáncer. El principal blanco en este sistema es la célula madre

histaminal, la cual está presente en médula ósea y es el origen de las líneas celulares mieloide y linfoide durante periodos prolongados. El avance general, al que se ha llegado en estos estudios es la incubación *ex-vivo* de médula ósea con vectores retrovirales, seguida de la infusión de estas células modificadas genéticamente en receptores cuya médula ha sido irradiada. La transferencia genica de estas células capaces de proliferar *in vivo* por largos periodos de tiempo, dando lugar a una progenie numerosa que se mantiene expresando el producto deseado, continúa siendo un reto. La principal limitación que se presenta es que las células hematopoyéticas que poseen este gran potencial de proliferación, permanecen en estado latente por lo que son resistentes a la transferencia genica mediada por retrovirus¹.

En el caso de la piel, existen varias razones de peso, para considerarla un tejido blanco de Terapia Genica² como se man que:

- Estas células ya han sido obtenidas, cultivadas, criopreservadas y transplantadas, haciendo posible que se utilicen células autólogas para una modificación genética³.
- Existe un número considerable de genes que han sido transducidos exitosamente en células de la piel como son: el que codifica para la hormona de crecimiento⁴, gonadotropina β-recombinante, lac Z⁵, los factores VIII y IX de la coagulación⁶, insulina humana⁷, transferrina humana, adenosin deaminasa⁸, etc.
- Los sistemas de transferencia de fibroblastos y queratinocitos genéticamente modificados ya se encuentran disponibles y están siendo sometidos a pruebas clínicas⁹.
- Los procedimientos de trasplantes de piel se realizan rutinariamente.
- La piel es accesible para la observación de efectos no deseados de la Terapia Genica en su estructura y funcionamiento. Si se presenta algún evento no deseado es posible remover el tejido con facilidad.
- Su irrigación sanguínea le permite transportar productos génicos terapéuticos hacia la circulación sistémica.

- En el caso del epitelio, éste se renueva constantemente, por lo que existe un gran potencial de transducción.

De las enfermedades genéticas conocidas en el hombre, 5% se encuentran asociadas fenotípicamente con la piel, pero sólo algunas de ellas se tienen bien definidas molecularmente. Una de las razones por las cuales está limitado el desarrollo en esta área es que muchos desórdenes de la piel se manifiestan con síntomas clínicos similares²¹.

También ha sido posible la transferencia genica a músculo esquelético por medio de la inyección directa de DNA. Su habilidad para incorporar y expresar DNA desnudo es única, de acuerdo con los resultados obtenidos en experimentos con otros tejidos²². Estudios recientes han demostrado que mioblastos modificados genéticamente pueden ser inyectados en músculo esquelético y que logran fusionarse al mismo expresando el gen de interés²³. Una de las aplicaciones potenciales utilizando estas células es el tratamiento de defectos genéticos que causan distrofia muscular. Sin embargo, los mioblastos pueden ser aplicados más ampliamente, ya que se ha demostrado que si son modificados para secretar alguna sustancia, esta es posteriormente encontrada en torrente sanguíneo. Por ello, estos pueden ser empleados para enviar una amplia variedad de sustancias requeridas en sangre o en otros órganos; por ejemplo insulina para el tratamiento de diabetes²⁴.

Las conocidas propiedades regenerativas del hígado, lo hacen un atractivo blanco para la Terapia Genica. Los problemas teóricamente corregibles con esta forma de terapia incluyen la hipercolesterolemia familiar, hemofilia, defectos en el ciclo de la urea, deficiencia de α -1-antitripsina y fenilcetonuria.

Otros tejidos blanco para terapia son las células epiteliales respiratorias para el tratamiento de la insuficiencia respiratoria en fibrosis quística y el tejido de sistema nervioso central, para el tratamiento de desórdenes neurológicos degenerativos²⁵.

ESTRATEGIAS DE LA TERAPIA GÉNICA

Historicamente la Terapia Génica ha sido percibida principalmente como una terapia de reemplazo donde el gen defectuoso puede ser substituido o compensado por otro gen funcional. De hecho, el primer protocolo de Terapia Génica aprobado legalmente en Estados Unidos (septiembre de 1990) implicaba la transferencia del gen que codifica para ADA (adenosin deaminasa), para la corrección de la Inmunodeficiencia severa combinada por deficiencia de ADA¹. Sin embargo, no fue precisamente la transferencia de un gen el primer intento clínico, sino su marcaje para seguir la pista de los linfocitos tumor infiltrativos (TIL's), después de su infusión en un paciente con melanoma¹.

A través de los años, los investigadores han ideado nuevas formas de Terapia Génica que les permitan atacar un rango mas amplio de enfermedades o bien tener mayores alternativas de terapia para una sola enfermedad. Una de estas formas de Terapia Génica es la transferencia de genes que estimulen la inmunidad contra cierto tipo de células como las tumorales, un ejemplo de ello es la transferencia del gen TNF- α que codifica para el factor de Necrosis Tumoral. O bien, genes que permitan que las células deseadas presenten multiresistencia a fármacos. Esto también es aplicado en cáncer, donde un gen de resistencia a multifármacos es introducido en células jóvenes hematopoyéticas para promover su selección *in vivo*, volviéndolas resistentes a varios agentes quimioterapéuticos¹¹.

GENES "SUICIDAS"

Una forma muy distante del reto inicial de la Terapia Génica es la transferencia de un gen que codifique para un factor de susceptibilidad, volviendo a la célula específicamente sensible a un agente exógeno. De este modo la expresión del gen causa la muerte celular, por lo que se dice que se trata de un gen "suicida"²².

El gen mejor manejado con este uso es el que codifica para la timidin cinasa (tk) del virus Herpes simplex (HS-tk) que, en contraste con la tk de mamíferos, es capaz de fosforilar ciertos analogos de nucleosidos como el aciclovir (ACV) o ganciclovir (GCV) a nucleósido monofosfato (MP); además de que se ha comprobado que sin su sustrato no causa daño alguno a las células²⁴. El MP es posteriormente fosforilado por cinasas celulares a nucleósido trifosfato e incorporado al DNA, provocando la inhibición de la síntesis de DNA y la muerte celular²⁵. En la tabla 3.1 se presentan los genes que han sido utilizados como genes "suicidas" con los mecanismos y efectos celulares que producen.

Gen "suicida"	Origen	Sustrato	Metabolito toxico	Efecto celular
HS-tk	viral	GCV → GCV-MP	GCV-TP	Inhibición de la síntesis de DNA
VZV-tk	viral	AraM → AraM-MP	AraTP	Inhibición de la síntesis de DNA
CD	micótico y bacteriano	5-FU → 5-FU* → 5-FU*	5-FU*	Inhibición de la síntesis de DNA
XGPT	bacteriano	6-TX → 6-TX-nMP	6-TX-nMP	Inhibición de la síntesis de DNA

TABLA 3.1
MECANISMOS DE ACCIÓN DE GENES SUICIDAS²³

Abreviaturas: HS-tk timidin cinasa del virus Herpes simplex, GCV ganciclovir, MP nucleósido monofosfato, TP nucleósido trifosfato, VZV-tk timidin cinasa del virus Varicela zoster, AraM 6-metoxipurinarabina nucleósido, CD citosin deaminasa, FC fluorouracina, F* fluorouracilo, F* fluorouridina 5'-TP y 5-fluoro-2'-deoxuridina 5'-MP, XGPT fosforibosil transferasa (proveniente de *E. coli*), TX tiocantina, TXnMP tiocantina nucleósido monofosfato

A partir de su descubrimiento, comenzaron a emplearse en protocolos clínicos. En junio de 1992, el RAC aprobó el primer protocolo que utilizaba estos genes en donde

selectivamente, eran eliminadas células tumorales en pacientes con tumores malignos cerebrales, hasta entonces incurables⁷³.

A continuación se presentan algunos de los protocolos que utilizan estos genes "suicidas".

Descripción	Enfermedad
Inyección <i>in situ</i> de fibroblastos tumorales productores de HS-tk + tratamiento con GCV	Cáncer en cerebro
Infusión intraperitoneal de células ováricas cancerosas HS-tk transducidas + tratamiento con GCV	Cáncer en ovarios
Infusión intravenosa de células T autólogas HIV-1 específicas HS-tk transducidas + tratamiento GCV	SIDA

TABLA 3.2
PROTOCOLOS QUE EMPLEAN GENES SUICIDAS⁷⁴

Uno de los aspectos que está siendo evaluado, es la contribución de genes "suicidas" para eliminar la cantidad inicial de células infectadas con HIV presente en pacientes seropositivos; con la esperanza de prevenir la progresión de la enfermedad⁷⁵. Por otra parte, se ha sugerido insertar uno o varios genes en modalidad de mosaico, como medida profiláctica para que incrementen la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, en huéspedes con alto riesgo a reincidir en neoplasias hematológicas induciendo así, la expresión del gen suicida en un tumor subsecuente. Esto resulta de gran interés en pacientes con enfermedades relacionadas con un alto riesgo de neoplasias fatales, como en el caso de los síndromes mielodisplásicos⁷⁶.

RIBOZIMAS

Son moléculas de RNA que hibridizan a una secuencia complementaria de RNA (vía Watson-Crick) y se anclan a ella en ausencia de proteínas⁷³. Se encuentran compuestas por dos dominios: uno de unión y otro de ruptura. Se han encontrado 5 tipos de dominios de ribozimas:

- Intrones del grupo I, cuyo papel natural es el de procesar RNA ribosomal. El solapamiento del intron de rRNA ocurre en 2 pasos, en el primero el nucleótido de G se agrega al extremo 5' del intron mientras que la unión intron/exon está siendo cortada; y en el segundo el exon 5' libre ataca a la unión intron/exon⁷⁴ y remueve al intron, generando un exon solapado⁷⁵.
- Ribonucleasa P, encontrada en bacterias. Está compuesta por una subunidad proteica pequeña y RNA catalítico. Su papel biológico es generar el extremo 5' maduro del rRNA por medio de un corte endonucleocatalítico de los transcritos precursores⁷⁷.
- Cabeza de martillo, se observó en viroides. El RNA es sintetizado en forma circular y esta ribozima por medio de hibridación, corta el mensaje policistronico en transcritos de RNA individuales⁷⁸.
- Horquilla, también encontrada en viroides de plantas. Tiene un papel similar a la anterior⁷⁹.
- Virus de Hepatitis delta, su RNA tiene un procesamiento autocatalítico similar a los dos anteriores. Los detalles de sus dominios, tales como secuencias mínimas y requerimientos de sustratos, se están caracterizando⁸⁰.

La particularidad de las ribozimas que revolucionó el mundo de la biología molecular, es que tienen funciones descritas únicamente para proteínas; actúan como enzimas que catalizan su propio corte o el de otras moléculas de RNA, además pueden unirse, cortar y remover secuencias específicas. La clave de esta actividad radica en su estructura ya que

contienen extensiones de nucleótidos que se unen a una región complementaria de RNA y mediante una sección catalítica similar al sitio activo de una enzima, cortan el RNA enlazado mientras el apareamiento de bases lo mantiene fijo. Estas propiedades hacen al RNA catalítico un material ideal para la bioingeniería. Una ribozima puede ser diseñada para reconocer y unirse a cierto RNA celular que el investigador desee eliminar²¹.

Dentro de los tipos de ribozimas que se conocen, el diseño de cabeza de martillo se seleccionó como terapéutico por ser el más pequeño, el mejor caracterizado con respecto a sus secuencias blanco y además por poseer secuencias de nucleótidos conservadas dentro de su núcleo catalítico²². La figura 3.1 representa el diseño cabeza de martillo formado a partir de la ribozima enlazada a su sustrato. Las bases que flanquean ambos lados del tallo II conforman el núcleo catalítico. Estas secuencias son CUGAUGA en el extremo 5' y GAAA en el extremo 3'. Este tallo puede variar en secuencia y longitud. El sustrato y la ribozima hibridizan para formar los tallos I y III, orientando los nucleótidos U y H del sustrato sobre el centro catalítico. El nucleótido H puede ser A, C o U pero nunca G²³.

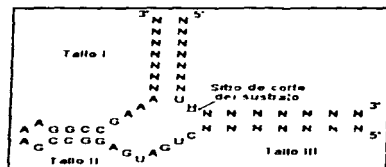


FIG. 3.1
ESTRUCTURA DE LA RIBOZIMA CABEZA DE MARTILLO²³

La hibridación de la ribozima al sustrato, su asociación del mismo y la disociación de los productos cortados por la ribozima; son controlados por la longitud y la composición de los brazos de enlace. Como las ribozimas están compuestas de RNA, son susceptibles a

enzimas degradativas dentro y fuera de la célula por lo que se ha desarrollado ribozimas resistentes a estas nucleasas. Las estrategias empleadas son la modificación del esqueleto de enlaces fosfodiéster a fosforitrionato, y del 2'-OH a 2'-fluoro, 2'-amino, etc. Otra opción es acoplar estructuras secundarias que inhiben la degradación de la nucleasa o bien, la circularización del RNA, que lo hace inaccesible a la exonucleasa⁷⁵.

Son tres las opciones que permiten la transferencia de la ribozima a la célula: la entrada de ribozimas sintéticas, su expresión a partir de un vector transitorio, o su expresión a partir de un vector integrado. Las ribozimas sintéticas son muy similares a los fármacos convencionales y requieren múltiples administraciones, su gran ventaja es que no producen efectos citotóxicos colaterales. Sin embargo, es poco eficiente su entrada, pero puede ser mejorada con el uso de lípidos catiónicos⁷⁶.

Los retrovirus y virus adenoasociados son transfectantes estables mientras que los adenovirus son transitorios. Una transfección permanente permite una expresión continua de la ribozima, aunque la expresión transitoria puede ser aplicada a enfermedades donde sean toleradas administraciones múltiples. Una transfección que dé como resultado una expresión transitoria, puede tomar dos formas: la viral, en donde se ha logrado alcanzar niveles terapéuticos de la expresión de la proteína, mantenidos hasta por 3 semanas. La desventaja que se presenta es la recombinación y la inmunogenicidad que el virus pueda crear. La segunda forma es la no viral, usando la doble cadena de DNA que exprese la ribozima, mediante una inyección directa (en músculo esquelético) o mediante lípidos catiónicos. De hecho la fase I preclínica para el tratamiento de melanomas, ya los utiliza. Para que la ribozima sea efectiva, debe estar en exceso con respecto al RNA blanco o localizarse cerca del blanco para incrementar su concentración efectiva. Por otra parte el promotor de la ribozima debe ser un promotor más fuerte que el del RNA blanco⁷⁷.

Hampel, de la Universidad de Illinois, invirtió años en la investigación bioquímica de la estructura de horquilla que presenta la ribozima. Posteriormente formó equipo con

Wong-Staal y la modificaron para que reconociera y se anclara a una secuencia cercana al inicio del RNA del HIV, el cual se conserva en diferentes clases de HIV. Cuando esta fue probada en un cultivo celular, la ribozima redujo la cantidad de virus producidos por las celular infectadas en unas 10,000 veces. Para una aplicación *in vivo* se removieron del torrente sanguíneo, los linfocitos T infectados y se trataron con un retrovirus que contenía el gen que codifica para la ribozima. Posteriormente se regresaron las células modificadas a los pacientes. Las ribozimas fabricadas para SIDA han sido diseñadas para ir en contra de la proteína gag, la secuencia líder del LTR 5' y la proteasa. Su aplicación más efectiva es contra la segunda. Algunos otros grupos trabajan en estrategias relacionadas, algunos de ellos toman en cuenta factores como la notable habilidad del HIV para mutar. Algunos laboratorios están uniendo varias ribozimas, cada una dirigida a diferentes partes del genoma del HIV, para evitar así el bloqueo del ataque por medio de una simple mutación. También se está desarrollando un camino para enviar la ribozima al sitio de la célula donde el RNA del HIV se acumula, así ésta se unirá más rápidamente⁶¹.

Es importante también no sólo mandar la ribozima a un sitio específico de la célula, sino antes que nada a las células correctas. En el caso de la hepatitis crónica tipo B, las ribozimas son una terapia potencial ya que uno de los tipos de ribozima tomada del viroide delta tiene afinidad por células hepáticas, por lo cual puede ser explotado este virus, no solo como fuente de ribozimas, sino también como vehículo de transferencia⁷⁷.

En cáncer hay dos aplicaciones reportadas, en la primera se trata de inhibir la proliferación celular empleando una ribozima en contra del oncogen *ras* (contra la secuencia GUC) que sufrió una mutación puntual convirtiendo la secuencia GUG en GUC. La segunda trata la leucemia mieloide crónica (LMC). En la primera etapa de la transformación linfocitaria hay una translocación de c-abl del cromosoma 9 al cromosoma 22, resultando en la formación de la proteína de fusión *bcn-abl*. La ribozima se diseña para

que un brazo hibridice el sitio *ter* y otro brazo el sitio *abl*, de modo que solo el mRNA del producto de fusión pueda anclarse⁶¹.

La tecnología de las ribozimas es una gran promesa por la amplia aplicación que puede tener en el tratamiento de enfermedades. A diferencia de pequeñas moléculas de fármacos que son efectivas en la cura de alguna enfermedad pero tienen efectos colaterales; las ribozimas poseen una gran especificidad sin presentar estos efectos colaterales. Su principal limitación es la identificación de la proteína responsable de la enfermedad, sin embargo, el avance en el proyecto del genoma humano, permitirá reducir significativamente esta limitación⁶².

AGENTES TRIPLEX Y ANTISENTIDO

En el interés por descubrir la "bala mágica", un fármaco capaz de curar una enfermedad sin producir ningún efecto colateral; los investigadores han llegado a utilizar segmentos de DNA (estrategia Triplex) o bien RNA mensajeros (estrategia Antisentido), que impidan la transcripción o traducción de los genes seleccionados. Los agentes más estudiados que se unen a ácido nucleico son los oligonucleótidos de DNA. Los ácidos nucleicos se combinan con otros bajo reglas bien conocidas, por lo que pueden diseñarse oligonucleótidos que reconozcan un sitio único en el gen elegido o en el transcrito de mRNA, teniendo así la especificidad de una bala mágica⁶³.

En las Terapias Genéticas convencionales, se administran genes sanos como sustitutos de versiones que han perdido o son incapaces de dirigir una síntesis adecuada de la proteína que se necesita. Los oligonucleótidos en cambio, no dan origen a una proteína, sino que tienen la habilidad de bloquear la expresión de los genes ya existentes⁶⁴.

El uso de un oligonucleótido para detener la transcripción es conocido como la Estrategia Triplex porque el nucleótido se enreda alrededor de la doble hélice de DNA formando una hélice triple. El motivo del nombre Estrategia Antisentido es menos evidente,

Debido a que la secuencia de bases a lo largo de un RNA mensajero codifica para una serie de aminoácidos, se dice que la secuencia tiene sentido. Para que una molécula pueda unirse a la cadena con sentido, es necesario que este formada de oligonucleótidos con las bases complementarias, es decir que tenga una secuencia en antisentido. La practica de inhibir la traducción con oligonucleótidos formados por bases complementarias a las del RNA mensajero, es conocida como estrategia Antisentido⁶¹.

Los oligonucleótidos antisentido son los primeros de las nuevas medicinas geneticas, que han alcanzado los estudios clinicos. Desde 1980 se noto su producción en ciertos microorganismos, y a la fecha es claro que celulas vegetales y animales emplean en algunas ocasiones la estrategia Antisentido para controlar su expresion genica⁶².

Con la tecnologia del DNA recombinante se han podido crear genes que den origen a versiones antisentido de RNA's mensajeros seleccionados. Para su aplicacion, en muchos casos incluso, se ha preferido administrar pequenas cadenas del nucleotido sintetico en lugar del gen que lo codifica. Sin embargo, los problemas a los que se han enfrentado son que en primer lugar, los oligonucleotidos llevan una carga negativa en cada grupo fosfato por lo cual su difusion a través de la membrana celular es dificil y en segundo lugar, las celulas poseen enzimas que destruyen DNA exogeno, por lo que son degradados rapidamente. Para resolver estos problemas se reemplazo el atomo de oxigeno del grupo fosfato, por un grupo metilo eliminando la carga negativa. Pero ahora los oligonucleotidos se volvieron hidrofobicos, por lo cual se decidio cambiar el atomo de oxigeno por uno de azufre. Este permitio a los oligonucleotidos ser solubles, más resistentes a la degradación enzimática y penetrar a la célula no sólo por difusion directa sino también por endocitosis⁶² (fig. 3.2).

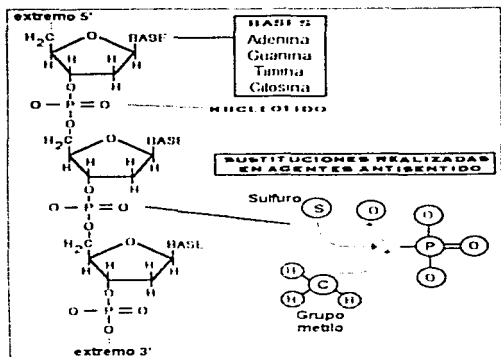


FIG. 3.2
CONSTRUCCION DE NUCLEOTIDOS ANTISENIDO²

Las investigaciones realizadas durante los últimos 15 años han revelado factores importantes que deben ser tomados en cuenta para diseñar fármacos antisense, como el hecho de que la cadena debe ser de 15 oligonucleótidos como mínimo para evitar que se asocie a sitios no deseados. También se ha establecido que los oligonucleótidos detienen la traducción al menos mediante dos métodos: interfiriendo la lectura del RNA con sentido y además, por su unión al mRNA pueden estimular una enzima (ribonucleasa H) que corta y destruye el mRNA enlazado. Los reportes obtenidos de estudios animales indican que los agentes antisense no exhiben toxicidad.

Los primeros nucleótidos antisentido en alcanzar el mercado serán probablemente aplicados a combatir infecciones virales. Los laboratorios Farmaceuticos ISIS en Carlsbad California dirigen un estudio clinico de un oligonucleótido dirigido contra transcritos de un gen viral importante en la replicacion de los papilomavirus humanos, causantes de verrugas genitales⁸². Se reporta que dichos crecimientos han disminuido e incluso desaparecido en muchos pacientes que han recibido inyecciones en piel. Otro estudio clinico preliminar es con pacientes infectados con HIV⁸². Los cientificos de la Agencia Nacional de Investigacion sobre SIDA en Francia evaluan la fabricacion del oligonucleotido dirigido contra el RNA producido por el gen *gag* del HIV. Tambien, han comenzado los estudios en cancer, con pacientes que padecen Leucemia mieloide aguda. El tratamiento consiste en remover la medula ósea del paciente y tratarla con el oligonucleotido que destruya selectivamente las celulas cancerosas, despues se administra quimioterapia al paciente y se le regresan sus células "purgadas". El oligonucleotido en estudio es el que se dirige contra el RNA generado por el gen *p53*, el cual al parecer esta sobreexpresado en pacientes con leucemia mieloide⁸². Para mejorar la estabilidad de los oligonucleotidos Claude Hélene y sus colegas han fabricado nucleotidos que llevan consigo grupos quimicos capaces de insertarse entre los pares de bases del duplex RNA-DNA, dicha intercalación estabiliza el enlace y prolonga la actividad antisentido⁸².

Por otra parte la estrategia Triplex que tuvo sus inicios desde 1950, ha recibido menos atencion en los ultimos tiempos. Cuatro años despues de que Watson y Crick descubrieran la estructura de la doble hélice del DNA, Gary Esenfeld y Alexander Rich⁸² comenzaron sus exploraciones en estructuras multiples de DNA formadas por acidos nucleicos. Para su sorpresa, encontraron triples hélices de UAU, en las cuales una cadena adicional que contenia nucleotidos de uracilo se unia a la doble hélice en AU. Subsecuentemente, Chamberlin y colaboradores⁸² mostraron que los polimeros de DNA que contenian T o A solamente, podian ensamblarse en triples hélices de TAT. Morgan y Wells

establecieron que nucleótidos de C podían unirse a dobles hélices de GC sólo cuando las moléculas se encontraran en una solución ligeramente ácida, debido a que la cadena extra de citosina requiere un proton adicional. La estructura resultante era C*GC triple.

Durante casi una década estos triplex, carecieron de importancia, sin embargo, a finales de los 60's Morgan y Wells⁸⁷ establecieron que las triples hélices que contenían unidades TAT y C*GC podían formarse mediante la combinación de un oligonucleótido que contuviera T y C con una doble hélice que contuviera AT y GC. Esto sugería que era posible que la triple hélice se presentara de manera natural en los genes⁸⁸.

A finales de 1980, teniendo un mayor conocimiento de la regulación en la transcripción génica, los investigadores concluyeron que debían concentrar sus esfuerzos para diseñar oligonucleótidos que se unieran a la región de control del gen elegido, la cual regula la tasa de transcripción. En 1987, se encontró que bajo ciertas condiciones, genes naturales que contienen sitios ricos en AT y GC pueden combinarse con oligonucleótidos diseñados para formar triplete TAT y C*GC. En estos experimentos, los Triplex surgen cuando una cadena del DNA blanco está formada principalmente por bases puricas (A y G) dejando las bases pirimidínicas (T y C) a la otra cadena.

Los triplex, como Morgan y Wells ya habían encontrado, no aparecen en niveles fisiológicos de pH, para solventar este problema Eryin⁸⁹ agregó un átomo de yodo o un grupo metilo a los oligonucleótidos estándar. En 1988 Hegan⁹⁰ generó una nueva variedad de Triplex. Estos oligonucleótidos generaban tripletes GGC en lugar de C*GC.

Para poder crear fármacos Triplex, los diseñadores tienen que entender con exactitud cómo interactúa el oligonucleótido con su blanco. Cada base de oligonucleótido establece dos nuevos puentes de hidrógeno con la base purica del duplex. Algunos oligonucleótidos se orientan paralelamente como los que contienen C y T; otros se orientan antiparalelamente como los que contienen G y T. Estas diferencias deben ser tomadas en cuenta, para no fallar en el reconocimiento del DNA blanco.

En 1988 otros investigadores trabajaron con el gen *c-myc*. Este fue colocado en un tubo de ensayo junto con el oligonucleotido y varios componentes celulares obteniéndose buenos resultados: la formación del triplex previno la transcripción de los genes virales seleccionados. Estudios en células vivas realizados por Hélène abrieron paso a una posible aplicación en la clínica. Oligonucleótidos dirigidos contra la región del gen que codifica para el receptor de interleucina-2, inhibieron su expresión. Poco tiempo después se encontró que un oligonucleotido dirigido contra la región reguladora del gen *c-myc* podía inhibir su transcripción en una línea celular humana⁶².

Los investigadores confrontan varios retos, entre ellos el hecho de que los oligonucleotidos que detienen la transcripción en células, lo hacen sólo si se encuentran en altas concentraciones. La mayor limitación es que los blancos deben tener todas sus purinas en una misma cadena. Sin embargo, más de la mitad de los blancos potenciales contienen una mezcla de purinas y pirimidinas en cada cadena. Como primera solución se han reemplazado los grupos fosfato con un grupo químico que les permite a los oligonucleotidos "saltar" de una cadena a otra.

Las tecnologías Triplex y Antisentido están lejos de la perfección aún, sin embargo, se espera que estos agentes lleguen a ser comunes en el tratamiento de enfermedades virales y genéticas, para las cuales aún no existe una terapia efectiva.

Las aplicaciones clínicas alcanzadas por la Terapia Génica aún son escasas, sin embargo, cada uno de los estudios que se inicia en este campo tienen como meta común el poder ofrecer una terapia segura y de preferencia definitiva a la enfermedad para la que fue desarrollada. De los protocolos aprobados por las organizaciones encargadas de regularlos, podemos encontrar que la gran mayoría son tratamientos por periodos de tiempo indefinidos, esto debido a que aún no se logra diseñar vectores lo suficientemente eficientes. Las aplicaciones que puede lograr la Terapia Génica comprenden el tratamiento, la cura y la profilaxis contra desórdenes tanto congénitos como adquiridos que, unos cuantos años atrás, ni siquiera se conocía cual era la causa de su existencia. En este capítulo se hace una recopilación de algunos de estos desórdenes y los avances que se tienen en su tratamiento con Terapia Génica.

ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Durante las dos últimas décadas se han logrado grandes avances en el descubrimiento de las bases moleculares de varias enfermedades. Ha sido identificado el defecto proteico en más de 200 errores congénitos del metabolismo e incluso la lesión molecular específica en los genes que codifican para estas proteínas. Varios de los métodos terapéuticos se han encaminado a aminorar los defectos metabólicos causados por estos desórdenes, incluyendo restricciones dietéticas, el uso de quelantes, suplementación de cofactores y recientemente el reemplazo enzimático y el alotransplante. Sin embargo, estas terapias resultan ser poco efectivas e incluso algunas de ellas, inespecíficas. Numerosos

desórdenes metabólicos, la mayoría de los cuales son recesivos, tienen efectos devastadores como son retraso mental, deterioro del sistema nervioso periférico, ceguera, deficiencia auditiva, organomegalia e inestabilidad metabólica. Aunque la mayor parte de estos desórdenes son poco frecuentes, pocos de ellos pueden ser tratados con fármacos y conducen a la muerte del individuo. El único medio capaz de curar, más que de tratar estas enfermedades es el de reemplazar o corregir los genes defectuosos. Este es el objetivo de los esfuerzos actuales por desarrollar una Terapia Génica para el tratamiento de las enfermedades metabólicas heredadas⁶¹.

Cuando se enfocan esfuerzos al desarrollo de una Terapia Génica para desórdenes metabólicos, deben ser tomadas en cuenta algunas consideraciones por ejemplo, el que a diferencia de terapias para enfermedades como hemoglobinopatías, este tipo de terapia no requiere de una estricta regulación génica. Para la mayoría de las deficiencias enzimáticas, la enfermedad clínica aparece solo cuando la actividad enzimática se encuentra severamente reducida, incluso 5-25% de la actividad normal puede proteger de la enfermedad clínica. Un ejemplo de ello es la Hemofilia B, la cual resulta de la deficiencia del factor IX de coagulación; individuos que tienen menos de 1% del nivel normal de este factor están expuestos a sufrir hemorragias espontáneas mientras que aquellos con 1 a 10% presentan un riesgo moderado y aquellos con un 10 a 20% no presentan enfermedad clínicamente aparente⁶². Sin embargo, no todos los tratamientos resultan ser tan simples, la fenilcetonuria por ejemplo, donde la falta de la enzima hidroxilasa que convierte la fenilalanina a tiroxina, produce una deficiencia hepática y acumulación de metabolitos tóxicos que causan retraso mental; no puede ser tratada como la deficiencia del factor IX mediante la transferencia del gen normal a tejidos ectópicos, ya que requiere de cofactores hepato-específicos necesarios para la actividad de la hidroxilasa⁶³.

Como puede notarse, el defecto implicado, la necesidad de cofactores y los tejidos afectados son consideraciones importantes en el desarrollo de protocolos basados en Terapia Génica

para un desorden en particular. A continuación se presentan algunos ejemplos de Terapia Génica aplicada a desórdenes metabólicos.

FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística es un desorden autosómico recesivo que afecta uno de cada 2,500 nacimientos en la raza blanca⁶⁶. La enfermedad se caracteriza por un transporte anormal de iones Cl⁻, los cuales se encuentran ligados osmóticamente al flujo de agua provocando una deshidratación en las mucosas y por tanto un incremento en la viscosidad de las secreciones de las vías respiratorias, que impide el aclaramiento mucociliar. Esto trae como consecuencia el desarrollo de infecciones bacterianas crónicas que provocan severas reacciones inflamatorias, una destrucción gradual del pulmón y finalmente una muerte prematura⁶⁷.

Una gran variedad de tejidos epiteliales se ven afectados por esta enfermedad, incluyendo el respiratorio, pancreático y el epitelio intestinal. Sin embargo, la enfermedad pulmonar es la principal causa de mortalidad debido a que la proteína responsable de controlar este transporte iónico, presenta su más alto nivel de expresión en las glándulas submucosas que predominan en vías aéreas. Por esta razón, los primeros intentos de Terapia Génica que se han llevado a cabo para fibrosis quística están dirigidos solo a pulmón. La insuficiencia pancreática presente en un 80-90% de los pacientes, puede ser superada con suplementos pancreáticos y en el caso de la obstrucción intestinal, la cual es mucho menos frecuente, puede ser controlada con laxantes⁶⁸.

El gen que codifica para esta proteína, llamada regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (cftr), fue clonado en 1989, desde entonces se han reportado más de 300 mutaciones diferentes. La más común es la que implica la delección de 3 pares de bases del gen perdiéndose una fenilalanina en la posición 508⁶⁹. Esto produce una conductancia defectuosa de cloruros en las células epiteliales. Varios investigadores

han probado que *cfr* funciona como un canal de cloruros mediado por AMP cíclico⁹⁸. Esta función también parece ser importante en la regulación del transporte de sodio. De este modo, en individuos con fibrosis quística el ion Cl⁻ está reducido o ausente intracelularmente, mientras que el ion Na⁺ está incrementado dos o tres veces más de lo normal. Estas alteraciones en el transporte de iones pueden ser evaluadas con la medición de la diferencia de potencial⁹⁹.

Por tratarse de un desorden autosómico recesivo, se propuso la introducción de una copia normal del gen que codifica para *cfr* en las células epiteliales utilizando retrovirus y vaccinia virus. Con el uso del primer vector mencionado, se consiguió una función normal en el transporte de cloruros por más de 6 meses en un cultivo celular⁹⁸.

De los 46 protocolos de Terapia Génica humana revisados por la FDA ("Food and Drug Administration") a mediados de 1993, 38 implican terapia *ex vivo*. Este tipo de terapia es prácticamente imposible para el caso de fibrosis quística debido a que no es posible remover y reimplantar células epiteliales de vías respiratorias. Por lo tanto un requisito en la Terapia Génica para fibrosis quística es la transferencia *in vivo* por medio de vectores que sean eficientes y seguros para el uso humano.

Para desarrollar estos sistemas de transferencia genética, se requiere de DNA con un promotor adecuado unido al agente de transferencia. Dentro de los promotores específicos de pulmón que se han empleado se encuentran SP-C y CC10⁹⁰. Los vectores disponibles para esta terapia, pueden ser agrupados de una manera general en: aquellos que se integran al genoma de la célula huésped, como es el caso de retrovirus y virus adeno-asociados; y aquellos que funcionan de manera episomal como es el caso de conjugados moleculares, liposomas y adenovirus. Algunas ventajas y desventajas que presentan estos vectores para fibrosis quística se presentan en la tabla 4.1.

Se ha encontrado que la inflamación de las vías aéreas se incrementa conforme aumenta la dosis administrada de virus. En el caso de adenovirus títulos bajos hasta 10⁸

PTU/ml no causan daños apreciables, pero a partir de 10^9 PTU/ml se presenta una inflamación dosis-dependiente. Esto puede deberse a la antigenicidad de las proteínas de superficie virales y la respuesta de los linfocitos T citotóxicos. Respecto a los liposomas, estos demostraron citotoxicidad a dosis elevadas *in vitro*, pero en la práctica, no causan problemas *in vivo*. Por este motivo DC-choleDOPE recibió la aprobación de la FDA²⁶.

Vector	Ventajas	Desventajas
Adenovirus	Infecta células en estado latente, presenta tropismo por el epitelio respiratorio.	Se requieren varias dosis, la respuesta inmune está relacionada con la dosis, riesgo de mutagenesis por inserción.
Virus adeno-asociados	Defectuosos por naturaleza, no patógenos, se integran al genoma celular, infectan células en estado latente.	Tamaño pequeño, riesgo de mutagenesis por inserción posible con un virus de tipo silvestre.
DNA-Conjugados moleculares	Transfección de células en estado latente, son tejido-específicos por unirse a un determinado receptor de membrana.	Se requieren varias dosis. Altas dosis pueden causar una respuesta inmune.
Liposomas	Biodegradables, no tóxicos, no inmunogénicos, no virales, transfectan células en estado latente.	Baja eficiencia por lo que se requieren varias dosis.
Retrovirus	Se integran al genoma celular, virus bien caracterizados	Requieren de células en división, riesgo de mutagenesis por inserción.

TABLA 4.1
VECTORES EMPLEADOS EN FIBROSIS QUÍSTICA²⁶

En la actualidad, se tienen ya los primeros reportes de estudios en humanos. Zaborer y colaboradores²⁷ estudiaron la transferencia del gen que codifica para *cftr* mediada por adenovirus en la nariz de tres voluntarios con fibrosis quística. En ellos se presentó cierto grado de inflamación en el área de aplicación, probablemente debido al método de

administración empleado. Se pudo demostrar la presencia de mRNA del gen en dos de los sujetos. Con respecto a las anomalías bioeléctricas, la diferencia de potencial se redujo a un rango normal en los tres individuos. Estos cambios se mantuvieron durante 10 días posteriores a una aplicación única, a pesar de que el estudio no había sido diseñado para asegurar una expresión duradera¹¹.

El método de administración más ampliamente utilizado es la nebulización, ya que presenta ventajas como una difusión amplia, la cual puede ser regulada mediante el ajuste de la válvula y un tiempo de contacto mayor. Sin embargo, tiene la desventaja de que esta fuerza mecánica ejercida sobre el líquido puede dañar al vector, en particular alterando la estructura del complejo liposoma-DNA. Otro problema que se presenta es el hecho de que la capa mucosa (gel) puede impedir el acceso a la superficie celular, mientras que la capa acuosa (sol) puede diluir y alterar la composición de cualquier líquido aplicado tópicamente. Por ello se ha probado introducir liposomas por medio de una inyección intravenosa, evitándose la transferencia génica a otros órganos mediante el uso de promotores específicos¹².

Existe un gran progreso en el desarrollo de nuevos agentes de transferencia, sin embargo, la Terapia Génica para fibrosis quística sigue siendo una disciplina joven. Aún tomara algunos años el poder ofrecer este tratamiento como una alternativa segura a los pacientes, de hecho, existen dos razones importantes para retrasar la fase Clínica III. En primer lugar, el desarrollo tecnológico tan acelerado que se tiene el cual seguramente traera consigo una nueva generación de agentes de transferencia más seguros y eficaces. En segundo lugar, las pruebas clínicas a gran escala son costosas y requieren de tiempo y voluntarios, sería un gran error apresurar dichos ensayos con materiales inadecuados. El tratar de ir demasiado rápido, paradójicamente, retrasa el desarrollo de una Terapia Génica efectiva para fibrosis quística.

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad recesiva ligada al X que afecta uno de cada 3,500 niños. Una de las primeras manifestaciones clínicas de debilidad muscular es la tendencia a levantarse del suelo apoyando las manos en los muslos, esta maniobra conocida como signo de Gowers, es resultado de la debilidad de los músculos extensores de caderas y rodillas. Conforme la enfermedad progresa, la fuerza muscular se vuelve insuficiente para mantener la postura por lo cual, alrededor de los 12 años de edad, la mayoría de los pacientes utilizan ya silla de ruedas. Posteriormente se desarrollan deformidades musculares y pueden exacerbarse los efectos de debilidad muscular respiratoria que inevitablemente son fatales cerca de la tercera década. Puede también desarrollarse una cardiopatía progresiva en la última etapa de la enfermedad, aunque ésta no es la causa de la muerte¹⁴.

En 1953 se identificó una distrofia muscular moderada ligada al X, que posteriormente se encontró que era alélica a la distrofia muscular de Duchenne. Esta distrofia que lleva el nombre de distrofia muscular de Becker (DMB), tiene una incidencia de 1 en 30,000 hombres pero es casi tan prevalente como la DMD debido a que su avance es menos rápido, incluso se han reportado pacientes de mediana edad que aun pueden caminar. En ambas distrofias los pacientes exhiben defectos cognoscitivos, en el caso de DMD estos llegan a ser serios y cerca de una tercera parte de los pacientes se consideran con retraso mental¹⁵.

El examen histológico de secciones de tejido afectadas revela una extensa degeneración de las fibras musculares y poca regeneración de miofibras de diámetro pequeño, así como un amplio depósito de tejido graso o conectivo. Debido a que se han encontrado anomalías de la superficie membranal y niveles elevados de calcio intracelular, se piensa que el defecto molecular primario en la DMD, se encuentra relacionado con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana miofibrilar. Una vez localizado el gen (Xp21), se encontró que

éste codificaba para una proteína de gran tamaño (3,685 aminoácidos) llamada distrofina, la cual tiene homología con miembros de la familia de las proteínas citoesqueléticas, indicando que es componente estructural de las membranas musculares esqueléticas. La distrofina puede ser dividida en al menos, 4 dominios (fig. 4.1) de los cuales el central está subdividido en 4 regiones ricas en prolina que confieren flexibilidad a la molécula, hasta el descubrimiento de la utrofina, un homólogo autosómico de la distrofina expresado durante el desarrollo fetal del músculo esquelético, el dominio C-terminal no se asemejaba al de ninguna otra proteína. Las mutaciones que causan la DMD generalmente truncan a la distrofina antes de este dominio C-terminal, mientras que los pacientes con DMB expresan este dominio¹¹.

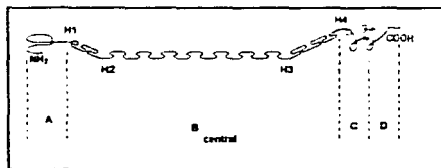


FIG. 4.1

ESQUEMA DE LA MOLECULA DE LA DISTROFINA¹¹

Dividida en 4 dominios: A dominio N-terminal, B dominio central, C dominio rico en pro, y D dominio C-terminal. El dominio central subdividido en 4 regiones ricas en prolina (H1-4)

En el intento por purificar a la distrofina de músculo esquelético se aisló un complejo de 6 proteínas asociadas (DAP's) de: 156, 50, 43, 35, 59 y 25 Kd, de las cuales las primeras 4 son glicoproteínas (DAG's) y de estas, las 3 últimas son proteínas transmembranales. La 59-DAP (sintrofina α y β) es una proteína extramembranal intracelular y la 156-DAG es una molécula altamente glicosilada que se encuentra en la superficie extracelular de la

membrana. Los dominios carboxi-terminales y ricos en cisteína parecen unirse directamente a 43-DAG y 59-DAP en el sarcolema mientras que el dominio amino-terminal de la distrofina se une a moléculas citoesqueléticas de actina, esto sugiere que el complejo distrofina-glicoproteína actúa como un puente molecular entre la matriz extracelular y la distrofina en el citoesqueleto cortical de la fibra muscular²³.

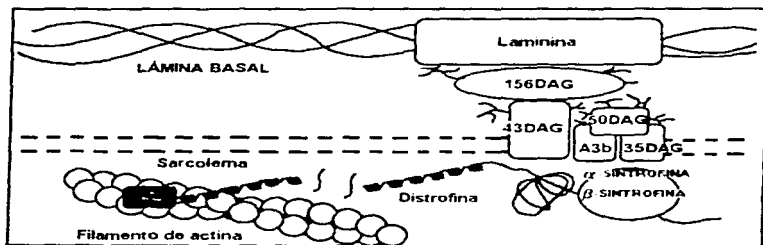


FIG. 4 2

ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA DISTROFINA Y SU INTERACCIÓN CON OTRAS MOLECULAS DEL SARCOLEMA²³

Existen al menos 4 transcritos distintos del gen DMD además del mRNA de 14kb encontrado en el músculo esquelético y todos ellos han sido encontrados en el SNC (neuronas de la corteza cerebral, en células de Purkinje del cerebelo, apo-distrofina-1 o Dp71 en células gliales, Apo-distrofina-2 o Dp116 en células nerviosas periféricas de Schwann)²³.

La identificación del defecto en un solo gen como la causa de la DMD abrió la posibilidad de tratar este desorden por medio de Terapia Génica mediante la introducción del gen recombinante de la distrofina. Los modelos animales que se han empleado comprenden: ratones, ratas y perros principalmente. En ratones se logró la expresión de

varios niveles de genes recombinantes de distrofina, reduciéndose e incluso desapareciendo la patología. Además se encontró que una sobreexpresión de distrofina no es aparentemente tóxica, sugiriendo esto que no es necesaria una estricta regulación génica en la Terapia Génica para DMD¹³.

El tejido blanco empleado en Terapia Génica para la distrofia muscular es músculo esquelético ya que presenta ventajas como son: ser estable, regenerativo, accesible y bien irrigado, sin embargo, la eficiencia de la transferencia es aun baja para ser considerada en protocolos con humanos.

Muchas estrategias de complementación genética han sido propuestas como tratamientos para la DMD incluyendo el trasplante de mioblastos de un donador¹⁴, el envío de "cassettes" que expresen distrofina recombinante mediante una inyección intramuscular de DNA desnudo¹⁵, o el uso de vectores retrovirales y adenovirales. Cada una de estas estrategias presenta limitaciones. A pesar de que 30-80% de fibras musculares del ratón transgénico *mdx* se vuelven distrofina positivas después de un trasplante de mioblastos, en humanos no se logran tan buenos resultados¹⁶. La inyección intramuscular del plásmido transduce sólo 1 a 3% de miofibras. Por otra parte, los vectores retrovirales infectan únicamente células en división impidiendo su aplicación a fibras musculares postmitóticas y neuronas las cuales son tejidos blanco de la DMD. Finalmente la transferencia mediada por adenovirus del gen de la *minidistrofina* tipo Becker, la cual resulta ser más eficiente en neonatos que en jóvenes y adultos, a pesar de expresarse en 5 a 50% de fibras musculares de ratón *mdx* neonato presenta la desventaja de que su expresión episomal es transitoria por lo que se requieren administraciones repetidas para mantener los niveles de expresión. Esto puede exacerbar los problemas de respuesta inmune, además debido a su relativamente baja capacidad clonal (8.5 kb aproximadamente) parecían ser poco útiles como vectores del gen de la distrofina¹⁷.

Un intento por hacer uso de las características positivas de los adenovirus y a la vez eliminar su genoma viral, responsable del desarrollo de una fuerte respuesta inmune; fue la fabricación de los llamados minicromosomas adenovirales, los cuales se basan en la observación de que el DNA adenoviral se encuentra empaquetado en los viriones en una modalidad polar de izquierda a derecha y es dependiente de elementos de empaque que actúan *in vivo*. El dominio de empaque Ad5 se extiende desde el nucleótido 194 al 358 y esta compuesto de 5 elementos diferentes que son funcionalmente redundantes. Teóricamente, cualquier molécula que contenga el origen Ad5 de replicación y los elementos de empaque debe replicar y ser empaquetada en viriones maduros en presencia de un virus silvestre no defectuoso. Se ha demostrado que los orígenes Ad de replicación son funcionales en los minicromosomas y este resultado sugiere que puede ser construido un virus artificial que no contenga genes virales pero si mantenga la eficiencia para infectar debido a su capsido viral. Para probar esta hipótesis se construyeron minicromosomas con capsides de adenovirus conteniendo el DNA que codifica para la distrofina bajo el control de un potenciador y promotor de 3.3kb, un gen que codifica para la beta galactosidasa bacteriana bajo el control de el potenciador/promotor CMV y el origen de replicación Aad junto con las señales de empaque virales¹⁰.

La delección de casi todo el genoma del adenovirus elimina la posibilidad de la expresión de genes adenovirales *in vivo* dando como resultado una gran reducción o ausencia de la respuesta inmune del huésped comparada con la provocada con la generación anterior de vectores adenovirales¹⁰.

ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La transducción y expresión de genes en tipos celulares apropiados representan pasos importantes en el desarrollo de la Terapia Génica, es por esto que los investigadores se han enfocado al desarrollo de métodos de transferencia y expresión de genes en las células

vasculares y miocitos cardiacos. Además para optimizar la transferencia génica a las células se requiere considerar características de la célula como son su capacidad de proliferación y ubicación dentro del tejido blanco. En este caso, las células vasculares y los miocitos cardiacos difieren especialmente en su capacidad de proliferación por lo cual es necesario utilizar estrategias distintas para transducir estas células¹⁷.

En el caso de células vasculares, el acceso que se tiene a ellas es por medio del flujo sanguíneo, percutáneamente, así como por segmentos arteriales localizados. Los primeros vectores utilizados fueron los retrovirales, sin embargo, la transferencia génica retroviral tiene limitada su aplicación a la medicina cardiovascular particularmente con respecto a la Terapia Génica *in vivo*, ya que es necesario que las células blanco se repliquen para que ocurra la integración viral. Se ha observado que después de un daño vascular o estimulación, como en el caso de un catéter globs, las células vasculares dañadas pueden ser transducidas en una buena proporción, por lo cual estudios previos sugieren que bajo estas condiciones la transducción retroviral a células vasculares puede ser utilizada exitosamente *in vivo*. Una limitación más que presentan estos vectores es lo lábiles que son comparados con otros virus ya que son rápidamente inactivados *in vivo* en primates debido quizá a la presencia de complemento en suero¹⁸.

Para mejorar la transferencia génica directa a arterias, los investigadores se han enfocado a los vectores adenovirales. Las ventajas que presentan estos vectores, como ya ha sido mencionado con anterioridad, es su capacidad de infectar células de mamíferos incluyendo a células en estado latente. Tanto *in vivo* como *in vitro*, se obtienen altos títulos y son partículas estables que permiten ser purificadas y concentradas. Su mayor desventaja es conferir una expresión génica transitoria (de algunas semanas) y provocar una respuesta inmune contra proteínas adenovirales¹⁹. Actualmente se construyen vectores con modificaciones para disminuir su inmunogenicidad que incluyen deleciones en las regiones E2 y E4 y modificaciones en la región E3²⁰.

Los sistemas conjugados que se basan en la transferencia génica mediada por receptor utilizando un adenovirus inactivado unido a un ligando como la transferrina para facilitar la entrada a la célula aun están siendo investigados para su utilización en la transferencia génica vascular al igual que los liposomas catiónicos. Estudios reciente sugieren que el complejo formado por el virus hemaglutinante japonés (HVJ) inactivado y liposomas presenta una mayor eficiencia de transfección en células musculares lisas vasculares, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* con daño vascular¹⁰². Esto nos permite intuir que futuras modificaciones a vectores usados para la transferencia génica vascular que incluyan componentes de vectores virales y no virales lograrán la optimización de la transferencia y expresión génica, minimizando los efectos secundarios no deseados.

Una estrategia más de transferencia local es el uso de geles poliméricos impregnados de oligonucleótidos aplicados a la superficie externa de arterias. A pesar de que aun no se ha definido con precisión la farmacocinética y retención de estos oligonucleótidos, los datos obtenidos sugieren que es suficiente para inhibir *c-myc*¹⁰³ y la expresión del mRNA de PCNA¹⁰⁴ 24 horas después de una lesión con catéter globo. Los plásmidos de DNA y vectores adenovirales han sido aplicados directamente a los globos de polietileno cubiertos con el hidrogel polimérico, el siguiente paso es llevar a cabo modificaciones en los polímeros que permitan una liberación controlada del agente terapéutico enviado a sitios específicos de los segmentos arteriales¹⁰⁵.

Por lo que respecta a la transferencia génica en miocitos, estos requieren de vectores con una actividad elevada de expresión y de un método de introducción hacia estas células miocárdicas. La inyección directa de plásmidos es un procedimiento simple que permite examinar el comportamiento de los genes *in vivo*, aunque esta limitada a la transfección de un pequeño número de células cercanas al sitio de inyección, además de esto, se ha observado que la expresión de estos genes es temporal¹⁰⁶.

Los adenovirus que de manera natural infectan células de mamíferos en estado latente como es el caso de miotubulos esqueléticos y cardíacos permiten una buena transferencia genica. A pesar de esto, su expresión también es transitoria y se han observado respuestas inflamatorias agudas en corazones inyectados con adenovirus. Estas respuestas también se han presentado después de la inyección de plásmidos⁷¹. La transferencia genica directa ha sido empleada para crear modelos transgénicos somáticos con el fin de definir la función genica presente en arterias, en estos sistemas se estudia la función biológica de los genes que se expresan en ciertos segmentos arteriales, un ejemplo de estos modelos es el empleado en el análisis de VCAM-1⁷².

También se ha intentado llevar a cabo una eliminación selectiva de la proliferación patogénica de células vasculares, expresándose el gen de HSV-tk en células de músculo liso y con la subsecuente incorporación de ganciclovir. Este experimento se llevó a cabo con éxito en cerdos, con una reducción del área de las capas íntima a media de 54 a 59%¹⁹⁷.

En el caso de la transferencia genica a miocardio, se ha logrado transducir, en animales como ratas y perros mediante inyecciones directas del plásmido de DNA, genes "reporteros", los cuales han permitido entender mejor la regulación genica cardíaca *in vivo*¹⁹⁸.

Como lo ilustran los hallazgos de las investigaciones descritas, el campo de la transferencia genica cardiovascular se ha desarrollado en una buena proporción, la transferencia genica sola, o en combinación con otras tecnologías genéticas ha sido útil en la creación de modelos animales para enfermedades cardiovasculares (entre ellos cerdos, conejos, ratas, perros etc.) en los cuales puede ser investigada la función de los productos génicos *in vivo*. Estas tecnologías muestran una opción para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares humanas, aunque aún se requiere de una investigación más profunda sobre aspectos técnicos para lograr una Terapia Genica más segura y con una mayor aplicación en enfermedades cardiovasculares.

INMUNODEFICIENCIA SEVERA COMBINADA

En septiembre de 1990, Ashanti Desilva de 4 años de edad se convirtió en la primera paciente que se sometió a una Terapia Génica aprobada para la Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID)¹¹. La incidencia de esta deficiencia es baja, aproximadamente 1 en 10⁶ nacimientos. La enzima deficiente, causante de esta enfermedad es la adenosin deaminasa (ADA), enzima monomérica de zinc expresada en altos niveles en el citoplasma de linfocitos maduros y presente en linfocitos T activados, epitelio y otros tejidos no linfoides. La deficiencia de esta enzima causa linfopenia debido a efectos tóxicos de sus sustratos¹². Los pacientes típicos tienen una forma recesiva de la SCID, la cual es fatal en la infancia o en la niñez temprana; los pacientes menos afectados presentan infecciones recurrentes e inmunidad defectuosa de células T desde los 2 hasta poco más de los 30 años de edad. La severidad clínica se correlaciona con la magnitud de los efectos bioquímicos causados por dAdo en los eritrocitos¹³.

El manejo de esta deficiencia ha ido evolucionando desde su descubrimiento en 1972, a principios de 1980 el trasplante de médula ósea era la única terapia efectiva, por lo que los pacientes sin un donador adecuado eran tratados mediante transfusiones de eritrocitos, como una forma de reemplazo enzimático. Sin embargo, ambos métodos eran poco confiables presentando un porcentaje de morbilidad elevado. Cuando en 1990 se consiguió la aprobación del primer protocolo por el NIH RAC, la situación cambió. Este protocolo de Terapia Génica para la deficiencia de ADA somete a los pacientes a leucoforesis con la finalidad de aislar las células mononucleares y sembrarlas en medios que estimulen la activación de linfocitos T. Una vez que las células T se encuentran dividiéndose, estas son incubadas con el vector retroviral quien contiene al gen que codifica para ADA y se les permite crecer durante algunos días antes de ser infundidas al paciente. Fue aplicado por primera vez en una niña de 4 años de edad quien había sido tratada durante dos años con terapia de reemplazo enzimático, basada en el conjugado PEG-ADA, en el cual la molécula

de ADA presenta una modificación de los residuos de lisina con el monometoxipolietilenglicol, prolongándose así el tiempo de circulación de la enzima.

Con este tratamiento, se presentó inicialmente una notable mejoría durante el primer año sin embargo, después de este tiempo la cantidad de sus linfocitos T disminuyó y como consecuencia presentó diversas infecciones. Durante los siguientes diez meses y medio recibió infusiones una o dos veces al mes de linfocitos con el gen que codifica para ADA, junto con inyecciones de PEG-ADA semanalmente. Los resultados obtenidos fueron muy alentadores ya que los estudios revelaron un mejor funcionamiento de su sistema inmunitario y condición clínica además de un número significativo de células T modificadas presentes en circulación (20 a 25% aproximadamente). En enero de 1991 se inició el tratamiento a una segunda paciente de 9 años de edad, quien recibió 11 infusiones de los linfocitos T corregidos. Como en el caso anterior, también se le aplicó semanalmente inyecciones de PEG-ADA.

Los resultados generados de estos dos casos indican que esta terapia es útil clínicamente hablando, ya que ambas pacientes presentan un avance notorio: tienen un promedio normal de infecciones y no hay efectos colaterales significativos debido a las infusiones celulares. Sin embargo, necesario también destacar la importancia que ha tenido el reemplazo enzimático como terapia de apoyo y como terapia única. Desde 1986 se trató al primer paciente con la preparación ADAGEN y de los 48 pacientes tratados con PEG-ADA hasta 1995, 39 (81%) continúan con esta terapia. De 28 tratados por más de dos años, 26 sobreviven y tendrán que estar bajo tratamiento de 2 a 8.5 años. Se han presentado 5 muertes (11%), todas de pacientes que no fueron candidatos a trasplante de médula ósea; 4 de ellas por anemia hemolítica autoinmune refractaria que se desarrolló a las 4-5 semanas del tratamiento después de un síndrome viral, el quinto paciente murió después de 6 años de tratamiento a los 15 años de edad de paro respiratorio y falla cardíaca, consecuencias de

una insuficiencia pulmonar crónica que había desarrollado durante los 9 años de transfusiones eritrocitarias, anteriores a la terapia con PEG-ADA¹¹⁹.

Haciendo una comparación con el trasplante de médula ósea haploidéntico, este no es posible cuando no se tiene un donador HLA idéntico, además aunque esta terapia es definitiva, se encuentra asociada a una mortalidad significativa. Por otra parte, se presentan retrasos al referir al paciente a un centro especializado en trasplantes de médula ósea y pruebas de HLA. Se requieren 3 a 6 meses de fase lag después del trasplante, antes de que se incrementen las células T del donador. Con PEG-ADA, se requiere una dosis relativamente estándar intramuscular que puede ser administrada por cualquier persona, mientras que con el trasplante de médula ósea se requiere utilizar varias técnicas para depletar la médula de células T del donador, esto con el fin de prevenir una respuesta injerto contra huésped. Incluso infecciones virales pre-existentes en la médula ósea del donador pueden exacerbarse por citorreducción, a la vez que los pacientes cursan con infecciones pulmonares activas, constituyendo estas razones el factor principal que provoca la falla del trasplante. Otras limitaciones que se presentan con el trasplante es el alto costo del procedimiento y la citorreducción que disminuye la respuesta a una subsecuente Terapia Génica. En el caso de PEG-ADA, la aplicación de esta terapia también representa un elevado costo que es de aproximadamente 100,000 dls. anuales en el caso de un niño y de 2 a 3 veces más en pacientes mayores¹²⁰.

La inmunodeficiencia severa combinada se convirtió en el foco de investigación de la Terapia Génica humana por varias razones¹, como son que:

- el gen de ADA ya había sido clonado
- se sabía que el reemplazo genico mediante trasplante de médula ósea era una terapia exósea
- existían limitadas opciones para pacientes que no podían ser transplantados
- se esperaba una ventaja selectiva de crecimiento *in vivo* de las células sanas

Por todo esto los investigadores de SCID que iniciaron la terapia con linfocitos alterados retroviralmente se apoyaron con inyecciones de PEG-ADA. Debido a que las células T no tienen una larga longevidad como las células tallo, se está intentando llevar a cabo la transferencia genica a nivel de estas células con la finalidad de que sea cada vez menor la necesidad de utilizar el reemplazo enzimático¹¹⁹.

FENILCETONURIA

La fenilcetonuria clásica es un desorden autosómico recesivo causado por la deficiencia de la hidroxilasa de la fenilalanina hepática, lo cual produce un incremento en los niveles de metabolitos de fenilalanina en sangre y orina y retraso mental irreversible. Poco después de que el defecto bioquímico fue identificado se iniciaron tratamientos basados en restricciones dietéticas. Este tratamiento cuando es iniciado en el periodo neonatal reduce significativamente los niveles de fenilalanina en suero y sangre y en gran medida previene el retraso mental. Sin embargo, esta terapia dietética no es perfecta ya que el sabor poco placentero de muchos de los productos bajos en fenilalanina suele desagradar a los pacientes especialmente a los adolescentes y adultos jóvenes de modo que abandonan el tratamiento conduciendo esto a una caída de la función neurofisiológica. En el caso de mujeres embarazadas que no siguen la dieta, esta enfermedad causa en el producto microcefalia, retraso mental y malformaciones congénitas. A este síndrome se le conoce como fenilcetonuria materna¹²⁰.

Los problemas asociados con el tratamiento convencional de la fenilcetonuria han promovido el desarrollo de la Terapia Génica. La transferencia de este gen terapéutico debe ser dirigida a un órgano en donde se encuentren los cofactores necesarios para un funcionamiento normal de la enzima, el más indicado es el hígado, ya que contiene pequeñas cantidades del cofactor reducido pterina. Son tres los vectores que han sido

desarrollados para esta transferencia génica: retrovirus, complejos DNA/proteínas y adenovirus recombinantes; cada uno de ellos con sus respectivas limitaciones¹¹²⁻¹¹⁵.

En el caso de vectores retrovirales, estos fueron empleados para transducir la hidroxilasa de la fenilalanina en una línea celular de fibroblastos de ratón. La transducción fue exitosa y pudo ser demostrada mediante la selección con análogos de neomicina, las colonias resistentes reflejaron el título de vectores retrovirales¹¹². Estudios posteriores indicaron que los vectores retrovirales eran capaces de infectar a hepatocitos primarios también, por lo cual se aislaron estos últimos, se cultivaron y transfectaron, alcanzándose niveles significativos de la enzima en los hepatocitos inicialmente deficientes. El siguiente paso es la reimplantación que puede llevarse a cabo mediante una inyección directa a bazo o vena porta. La terapia *ex vivo* puede realizarse mediante la aplicación directa del vector al órgano del paciente. Como los vectores retrovirales se derivan de los oncovirus, y por lo tanto sólo pueden transducir células en división; es necesario realizar una hepatectomía parcial para promover la división celular ya que el hígado tiene capacidad de regeneración. En condiciones óptimas, poco más de 1 o 2% de las células de hígado de ratón joven y 10 a 15% de las de rata fueron transducidas por vectores retrovirales después de una hepatectomía parcial; estos resultados sugieren una terapia útil en los casos donde el tratamiento de la enfermedad requiere sólo de cantidades traza del producto génico deficiente¹¹³.

Por otra parte los vectores adenovirales que presentan una alta frecuencia de transducción tanto *in vitro* como *in vivo*, especialmente en hígado, son dirigidos por el promotor del virus del sarcoma de Rous. Este vector fue empleado también en ratones y animales que presentaban menos de 1% de actividad enzimática, después de 5 días de la infusión en vena porta de 10^{10} PFU presentaron concentraciones normales de fenilalanina en suero y una actividad de la enzima de 10 a 80% de la normal. Además, los análisis referentes a la relación entre niveles de fenilalanina en suero y actividad hepática de la enzima

demostraron que sólo se requiere de 10 a 20% de la actividad normal de la hidroxilasa de la fenilalanina para prevenir la hiperfenilalaninemia en ratones con fenilcetonuria¹¹¹. Sin embargo, cuando se estudio la persistencia de este tratamiento mediante un monitoreo de los niveles de fenilalanina en suero, después de 2 a 3 semanas, los niveles elevados aparecieron de nuevo. Cuando se llevo a cabo una administración periódica, sólo los animales inyectados con amortiguador desde un principio respondieron al tratamiento, lo cual indica que se presentó una respuesta inmune en contra del vector adenoviral y esta fue la causa de la falla del tratamiento¹¹⁴.

Finalmente los estudios realizados utilizando endocitosis mediada por receptores han acoplado ligandos específicos como son la asialoglicoproteína, transferrina o folato. *In vitro* los mejores resultados se han alcanzado co-administrando adenovirus defectuosos, los cuales ayudan en la lisis del endosoma, antes que este sea digerido o transferido nuevamente a la superficie celular. Un acoplamiento directo del adenovirus al DNA reduce significativamente el número de partículas virales requeridas para alcanzar niveles altos de transducción. *In vivo*, sólo se ha logrado una mayor eficiencia mediante la administración de los complejos DNA/proteínas después de inducir división celular mediante una hepatectomía parcial¹¹⁵.

DESÓRDENES EN EL CICLO DE LA UREA

Existen muchos otros errores metabólicos causados por defectos metabólicos en el funcionamiento hepático, tal es el caso de los desórdenes en el ciclo de la urea. Estos desordenes son relativamente comunes, en conjunto tienen una incidencia mayor a uno de cada 30,000 nacimientos y comúnmente presentan enfermedades en la infancia que son diagnosticadas tardamente y resistentes a tratamiento. Sus sobrevivientes presentan crisis hiperamonémicas recurrentes, estudios de imágenes cerebrales correlacionan las

deficiencias cognitivas y anormalidades que se presentan en los pacientes hasta llegar al retraso mental, con la duración de los comas hiperamonémicos¹¹³

Todas las células producen amoníaco de su metabolismo proteico y cuentan con mecanismos bioquímicos para eliminarlo. En los humanos, quienes normalmente excretan de 10-20 g de nitrógeno diariamente, esta función se regula por medio del ciclo de la urea (fig 4.3), el cual está controlado por 5 enzimas: carbamil fosfato sintetasa (CPS), ornitina carbamoil transferasa (OCT), arginosuccinato sintetasa (AS), arginosuccinato liasa (AL), y arginasa. El ciclo completo solo se encuentra en hígado y con mucho menor actividad en intestino. Se han reportado deficiencias de cada una de las enzimas del ciclo. Un infante con defecto completo desarrolla coma hiperamonémico en la primera semana de vida y si el defecto no es tratado muere inevitablemente. Individuos con deficiencias parciales manifiestan síntomas en la infancia, su actividad enzimática es generalmente de 10 a 3% de la normal, presentan vómitos recurrentes perturbaciones en su conducta y progresan hasta el coma¹¹⁴. Estos errores congénitos fueron descritos a principios de 1960, en la siguiente década el tratamiento que se les dio fue basado en la restricción proteica, sin embargo, la tolerancia a este tipo de dieta fue tan limitada que más de 90% de los infantes afectados murieron de crisis hiperamonémicas. A mediados de los setentas se comenzaron a utilizar análogos de aminoácidos esenciales libres de nitrógeno con mejores resultados, aunque este tratamiento no trataba de una manera efectiva los episodios hiperamonémicos que se llegaban a presentar. En la siguiente década surgió el concepto de estimular rutas alternativas para la excreción de nitrógeno, esto implicó el uso de arginina, benzoato de sodio y fenilacetato de sodio o su conjugado fenilbutirato¹¹⁵ (ver fig. 4.3).

La tasa de sobrevivencia con esta terapia se incrementó significativamente en 50% para pacientes con deficiencias de OCT y CPS y más de 90% para pacientes con otros desórdenes en el ciclo de la urea. A pesar de esto, más de 75% de neonatos con estos desórdenes siguen padeciendo de comas hiperamonémicos y sufriendo daño cerebral con retraso mental y

otras discapacidades, es por ello que actualmente se estudia la posibilidad de corregir estos errores metabólicos mediante la Terapia Génica¹¹⁷.

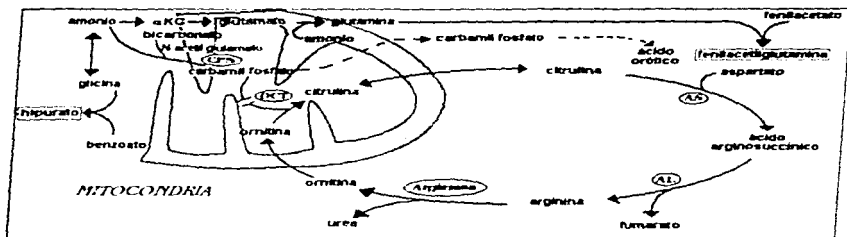


FIG 4.3

CICLO DE LA UREA Y RUTAS ALTERNATIVAS DE TERAPIA¹¹⁸

El ciclo de la urea está compuesto de 5 pasos enzimáticos. La CPS (carbamil fosfato sintetasa) y la OTC (ornitín carbamoil transferasa) son enzimas mitocondriales. Después de su formación la citrulina es exportada al citosol, donde es convertida en ácido arginosuccínico por la AS (arginosuccinato sintetasa). El ácido arginosuccínico es convertido a arginina por la AL (arginosuccinato liasa), la arginina es convertida a urea y ornitina mediante la ARGININASA. Una deficiencia en OTC provoca un incremento en los niveles de amoníaco y glutamina en plasma así como una mayor excreción de ácido orótico en la orina. La estimulación de rutas alternativas de excreción de nitrógeno comprende el uso de conjugados de benzoato de sodio con glicina para formar hipurato que se excreta en orina, fenilacetato de sodio que con glutamina forman fenilacetilglutamato. En el caso de deficiencias de AS y AL se emplea arginina suplementaria para estimular la excreción de citrulina y ácido arginosuccínico para formar productos nitrogenados alternativos.

La mayor parte de los estudios realizados para la aplicación de Terapia Génica en los desórdenes del ciclo de la urea han sido desarrollados con la deficiencia de la ornitín carbamoil transferasa (OCTD) debido a su severidad, su relativa frecuencia y la disponibilidad de modelos animales. Esta OCTD es una enfermedad recesiva ligada al X, aproximadamente un 60% de los hombres afectados presentan la forma más severa durante la primera semana de vida. Después de 24 a 72 horas, manifiestan bajo tono muscular y

letargia progresando rápidamente a coma. La actividad enzimática que presentan estos infantes es menor del 5% de la normal¹¹³.

Existen dos modelos en ratones con los que se trabaja¹¹⁶, la primera transferencia realizada fue la introducción del DNA que codifica para OCT unido a un promotor temprano de SV40 en óvulos fertilizados del ratón *spf^{+/+}* deficiente en OCT¹¹⁷. Se obtuvo una expresión exitosa del gen, presentándose una actividad de la OCT en hígado e intestino de 80 a 90% de los niveles control a diferencia de los ratones no tratados que presentan una actividad de 5 a 10%. Además, la excreción de ácido orótico en orina fue casi normal. Sin embargo, los estudios transgénicos en humanos carecen de justificación ética por lo cual se requieren otras estrategias. Al igual que en fenilcetonuria, estas se basan en el trasplante de hepatocitos autólogos corregidos genéticamente *ex vivo* con retrovirus recombinantes. Las desventajas presentes son: una eficiencia limitada, la necesidad de remover parcialmente el hígado y el riesgo de un futuro cáncer debido a la incorporación del vector retroviral en los cromosomas. En el caso de la Terapia Génica *in vivo* también se continúa trabajando en el diseño de vectores adenovirales menos inmunogénicos. Estos son los vectores que presentan mayores ventajas ya que la transcripción viral ocurre sin la incorporación al genoma y al ser introducidos en la circulación portal se produce un alto nivel de expresión génica en hepatocitos y no en otros tejidos, evitándose efectos colaterales relacionados con la expresión de estas proteínas en tejidos que normalmente no las expresan. Además, como algunos experimentos lo demostraron con ratones inmunodeficientes, la expresión de estos genes empleando vectores adenovirales puede ser estable y no acompañarse de respuestas inflamatorias por más de seis meses. Actualmente se debe trabajar básicamente en limitar la expresión de proteínas virales para evitar la producción de linfocitos T citotóxicos que eliminan a los hepatocitos modificados genéticamente y la inflamación¹¹⁵.

TIROSINEMIA TIPO I

Un último ejemplo de los avances que se tienen en la Terapia Génica aplicada a desórdenes metabólicos localizados en el hígado es la corrección de los hepatocitos aprovechando la selección *in vivo* que se presenta.

Como se ha mencionado con anterioridad, la transferencia génica retroviral permite una integración estable y una expresión del gen terapéutico duradera, sin embargo, logra corregir solo un pequeño porcentaje de hepatocitos *in vivo*. En contraste, los vectores adenovirales pueden infectar al 100% de las células hepáticas *in vivo* pero la expresión no persiste, debido a la naturaleza episomal del virus y al rechazo inmunológico que se presenta. Por ello, se ha llevado a cabo una selección *in vivo* como estrategia para una Terapia Génica hepática. Esto permite la selección y enriquecimiento de los hepatocitos corregidos *in vivo*¹²⁰.

La tirosinemia hereditaria tipo I (HTI) es causada por la deficiencia de la enzima fumarilacetato hidrolasa (FAH), último paso del catabolismo de la tirosina. La acumulación de su sustrato fumarilacetato (FA) y de su precursor maleilacetato (MAA) es hepatotóxica y mutagénica. Las estrategias con las que se cuenta actualmente para esta enfermedad incluyen una restricción dietética de tirosina y fenilalanina, el uso del fármaco 2-(2-nitro-4-trifluoro-metilbenzilo)-1,3-ciclohexanodiona, el cual bloquea el catabolismo de la tirosina corriente arriba de FAH previniendo la formación de metabolitos hepatotóxicos y el trasplante de hígado¹²¹.

Se ha observado recientemente que el hígado de pacientes con HTI frecuentemente contiene nódulos con actividad enzimática de FAH, debido a eventos de reversión somática¹²². Estos nódulos han sido detectados en 15 de 18 hígados durante el trasplante¹²³. Los estudios moleculares realizados han demostrado corrección de uno de los alelos causantes de la enfermedad. La elevada prevalencia de estas reversiones sugieren la posibilidad de una selección positiva de células productoras de FAH en hígado. Debido a esto se ha pensado

que si las células que expresan el gen de FAH tienen una ventaja de crecimiento sobre las células mutadas en este gen, este fenómeno puede ser aprovechado para obtener tanto una expresión estable y duradera como una corrección de la mayoría del tejido hepático mediante una transferencia genética retroviral *in vivo*. Los resultados obtenidos en estos experimentos han sido favorables ya que se ha logrado mantener una expresión génica elevada mediante la transferencia genética retroviral *ex vivo*, seguida de un trasplante autólogo de las células transducidas. Tanto en humanos como en animales superiores estos protocolos logran transferir de 0.1 a 1% de los hepatocitos y mediante solo 6 a 10 divisiones celulares y una selección positiva se logra reconstituir la mayor parte del órgano afectado. Estos resultados dan surgimiento a la posibilidad de que la Hipertirosinemia Familiar tipo I sea curable mediante procedimientos *ex vivo* de Terapia Genética retroviral¹²⁹.

Por lo que respecta a los riesgos de cáncer, los estudios realizados demuestran que la Terapia Genética para FAH fue efectiva en la restauración de una función hepática normal, pero en todos los hígados analizados se encontró una cantidad cuantificable de hepatocitos deficientes de FAH (5-10%) que se mantuvieron después de 2 a 3 meses. Sabiendo que la transformación maligna es común en la HTI así como en la deficiencia de FAH murina, sería aventurado asegurar que la transferencia genética retroviral *in vivo* representa una verdadera "cura" para este desorden y que es terapéuticamente equivalente a un trasplante de hígado. Tanto animales tratados retroviralmente como trasplantados deben ser seguidos clínicamente por un período de tiempo prolongado para determinar la incidencia de cáncer. Debido a que una vez que se ha regenerado el hígado del paciente hay una considerable reducción de la mitosis hepatocelular, esto podría prevenir el desarrollo de carcinomas, incluso en presencia de células residuales FAH deficientes¹³⁰.

DESÓRDENES NEUROLÓGICOS

Uno de los casos más frustrantes en los desórdenes metabólicos es el que se presenta con enfermedades que producen severos daños neurológicos o retraso mental. Los desórdenes que cursan con retraso mental pueden ser divididos en dos grupos, aquellos en los cuales el defecto metabólico primario se localiza fuera del sistema nervioso central (SNC), causando la acumulación de sustancias tóxicas que penetran al cerebro y le dañan (como la deficiencia de la hidroxilasa de fenilalanina que causa fenilcetonuria), y aquellos en los cuales el sitio primario de la patología se encuentra en el SNC (como los desórdenes de almacenamiento lisosomal neuropáticos, en donde la neurona es el sitio primario de la patología)⁸⁵.

Hasta la fecha, la mayor parte de la Terapia Génica desarrollada para desórdenes neurológicos se ha dirigido a la expresión de genes en células no neuronales como células hematopoyéticas y hepatocitos. En parte esto se debe, al escaso entendimiento y caracterización del SNC, así como a los obstáculos técnicos que deben ser superados para lograr una transferencia efectiva. El SNC presenta un problema único, debido a las características anatómicas y funcionales tan peculiares del cerebro. Por un lado, la barrera hematoencefálica que impide la entrada de macromoléculas a las células neuronales y por otra parte sus regiones perfectamente integradas pero anatómicamente y funcionalmente diferentes que requieren de una Terapia Génica que las englobe⁸⁵.

Existen tres estrategias alternativas que podrían permitir una transferencia génica global al SNC *in vivo*: la apertura transitoria de la barrera hematoencefálica, una inyección directa en el fluido espinal cerebral, y la introducción de genes en células endoteliales vasculares cerebrales para lograr una secreción vasolateral de los productos génicos⁸⁵.

En el caso de la apertura transitoria de la barrera hematoencefálica se ha pensado que podría permitir una buena ruta de transferencia al permitir el paso de macromoléculas de la circulación al parénquima del SNC. Esto se ha logrado con éxito en ratones y ratas,

mediante una inyección intracarotídal de concentraciones hiperosmolares de manitol y otros agentes que permiten una permeabilidad reversible de la barrera, debido a que las células endoteliales vasculares sufren una deshidratación transitoria incrementándose los espacios intercelulares. Esta permeabilidad podría ser usada para la transferencia de vectores virales y no virales al cerebro. En el hombre, la disrupción hiperosmolar de la barrera hematoencefálica ha sido aplicada a pacientes con cierto tipo de tumores cerebrales. La seguridad de este método repetido constantemente aun es incierta, a pesar de que se sabe actualmente que varios tipos celulares neuronales son capaces de presentar respuestas inmunes una vez que el aislamiento del cerebro ha sido roto por la apertura transitoria de la barrera hematoencefálica¹⁴.

En el caso de la inyección directa al fluido espinal cerebral, a pesar de que el fluido cerebral espinal normalmente transporta metabolitos fuera del SNC, macromoléculas como la ferritina (mayor de 500kD) difunden a través de los espacios intersticiales del parenquima del SNC. Esto ha sido logrado mediante un incremento en la osmolaridad del plasma. Experimentos en perros han demostrado que inyecciones intravenosas de manitol (3g/Kg de peso aprox.) revierten el sentido del fluido dirigiéndose ahora hacia la materia gris. Aunque éste es el método más conservador tiene la desventaja de tener que superar la dirección natural del fluido cerebral espinal mediante un incremento en la osmolaridad del plasma con manitol.

La tercera opción para obtener una transferencia neuronal global es la transducción de células endoteliales vasculares cerebrales, las cuales pueden secretar las proteínas terapéuticas a través de sus membranas vasolaterales en el espacio perivascular del SNC. El receptor de transferrina, que se encuentra en grandes cantidades en el lado luminal del endotelio cerebrovascular puede ser utilizado como receptor para una transferencia específica de los vectores empleados. Sin embargo, este método requiere que las moléculas terapéuticas secretadas se fusionen a un ligando neurotrópico para su entrada a las

neuronas. Este es un método relativamente simple y seguro que podría ser repetido fácilmente, aunque se necesita alcanzar una secreción suficiente de la proteína terapéutica que atraviese la membrana vasolateral⁵¹.

Como puede notarse, se requiere de nuevas estrategias para obtener vectores específicos de neuronas. Las lectinas o ligandos podrían ser empleados para la construcción de estos vectores. Se han identificado ciertos componentes de toxinas de *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum* así como polipeptidos de superficie de virus neurotrópicos como Herpes y Reovirus, que son responsables de su adsorción y entrada a neuronas; pudiendo ser empleados para la construcción de los vectores⁵².

Una vez que se ha logrado la internalización del vector se requiere también de altos niveles de expresión del vector, los cuales se consiguen mediante el uso de promotores virales como los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor y potenciador del citomegalovirus y los LTRs retrovirales. Es necesario considerar que sólo en ciertas enfermedades donde no se requiere que la expresión sea específica de un tipo celular, pueden emplearse promotores universales. En la mayoría de los casos los promotores específicos de neuronas son los que deben ser empleados.

Una elección óptima de secuencias reguladoras incluidas en el diseño del vector para una Terapia Génica neuronal es de suma importancia y debe ser tomada en cuenta para el desarrollo de "cassettes" dirigidos a SNC. En el caso de una Terapia Génica global *ex vivo* se tiene como alternativa el trasplante de células modificadas genéticamente a SNC. El mayor problema que se presenta aquí, es que se ha visto que las células transplantadas no emigran del sitio del trasplante, lo cual impide una transferencia global al SNC. Otra alternativa es el uso de células hematopoyéticas modificadas genéticamente, ya que ciertas células del SNC, conocidas como microglia derivan de la médula ósea e incluso, ciertos procesos patológicos incrementan su migración a través de la barrera hematoencefálica hacia el SNC. Estas células que parecen tener su origen en la línea de monocitos/macrófagos,

representan 15% de la población celular total, se encuentran distribuidas en todo el cerebro, aunque su concentración mayor es en la materia gris. Algunos investigadores han demostrado beneficios terapéuticos en enfermedades metabólicas neuropáticas con modelos animales que incluyen ratones, gatos y perros. Es por esto que podemos considerar a la transferencia de vectores mediada por células tallo hematopoyéticas como una opción real para tratar ciertas enfermedades neurológicas¹³.

Los vectores empleados en la Terapia Génica neuronal son los ya conocidos: dentro de los virales se encuentran retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y herpes virus. Estos últimos, por ser neurotrópicos son los más utilizados y han sido empleados con éxito para expresar genes en cerebro de ratón después de una inyección intracerebral¹⁴. Sin embargo, varios de los vectores recombinantes del virus *Herpes simplex* son citotóxicos, el número de células transducidas es pequeño y estas células solo se encuentran adyacentes al sitio de la inyección. Dentro de los sistemas de transferencia no virales se encuentran liposomas, plásmidos y conjugados moleculares, los cuales surgieron como una alternativa para resolver problemas asociados con vectores virales como es la respuesta inmune¹⁵.

Síndrome de Lesch-Nyhan, Modelo de Terapia Génica Directa a SNC

Este síndrome es causado en el humano por la deficiencia en la expresión del gen que codifica para la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Se caracteriza por coreoatetosis, hipouricemia, retraso mental y un comportamiento peculiar autodestructivo involuntario. Los estudios realizados sobre esta enzima y la enfermedad que causa su ausencia, han contribuido de una manera importante al desarrollo de muchos de los primeros conceptos en Terapia Génica. De hecho, el gen de HGPRT fue el primer gen terapéutico humano transferido a la médula ósea de un ratón¹⁶.

Existe evidencia de que este desorden está acompañado de alteraciones secundarias en el metabolismo de las purinas y deficiencias en las rutas bioquímicas responsables de la

biosíntesis del neurotransmisor dopamina; aunque esta relación aún no se logra comprender bien. A excepción de una reducción en el número de sitios de entrada de dopamina, no se ha encontrado otro tipo de defectos estructurales en el cerebro de pacientes con síndrome de Lesch Nyhan. Además, con excepción de la hiperuricemia, responsable del daño renal, tampoco se han encontrado acumulaciones de purinas u otros metabolitos en el cerebro¹²⁹.

La transferencia genica *in vivo* ha utilizado principalmente los vectores virales: virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), adenovirus y virus adeno-asociados, por ser capaces de infectar células en estado latente. Los HSV-1 son buenos candidatos ya que pueden infectar neuronas con gran eficiencia. En especial los mutantes del gen temprano inmediato 3 (IE-3) por expresar pocos genes virales y tener una replicación completamente defectuosa son los más útiles para la producción de vectores de transferencia genica. El último vector construido VP16, es incapaz de transactivar la expresión del gen IE pero sí de replicar, derivándose de él dos clases: 1411D3, la cual presenta delección en ambas copias de IE y 1850D42, que tiene una delección adicional en el gen temprano UL42. Como es de suponerse, este último resulta ser menos tóxico aun que el mutante IE-3 con una sola delección, además esta doble delección incrementa su habilidad para mantenerse en las células infectadas¹³⁰.

En el caso de adenovirus, algunos investigadores han logrado infectar neuronas en un SNC adulto con adenovirus humanos así como demostrar una expresión transitoria del gen de HPRT de rata empleando estos virus como vectores en monos¹³¹. Aunque este sistema posee las ventajas de expresarse eficientemente, obtenerse una producción elevada de la proteína y otras más ya mencionadas con anterioridad, también tiene la desventaja de inducir una respuesta inflamatoria en el órgano infectado y otras respuestas inmunes por lo que no se ha logrado establecer aun su utilidad y seguridad. Finalmente, los virus adeno-asociados a pesar de su habilidad para infectar células en estado latente presentan una integración no tan específica como se pensaba. Además los títulos que se obtienen de estos vectores son

relativamente bajos por lo que se requiere de mejores sistemas de producción y mayor investigación respecto a su seguridad¹²⁵.

La transferencia genica *ex vivo* es otra alternativa para el tratamiento de este desorden. Se ha intentado corregir la deficiencia de HPRT por alteración en la expresión del neurotransmisor dopamina, por lo que se ha trabajado en la fabricación de genes terapéuticos que codifiquen para factores, como el factor de crecimiento nervioso o componentes del sistema neurotransmisor de dopamina. Estos genes han sido introducidos a cultivos celulares y posteriormente las células son transplantadas a un sitio apropiado en el SNC para que restablezcan la función requerida *in vivo*¹²⁶.

Es de suma importancia establecer cual de todas las técnicas actuales de transferencia genica es la más útil para corregir defectos neurológicos en enfermedades del SNC y en particular en el síndrome de Lesch-Nyhan. El mayor obstáculo para esto, en el caso de este síndrome, es la escasa información que se tiene sobre la patogénesis de los defectos neurológicos que se presentan. Un claro ejemplo de este problema fue el trasplante de médula ósea que se llevó a cabo (en un adulto humano), con células HPRT positivas, pensando que estas podrían poblar parte del SNC con microglía HPRT-positiva, interactuar con neuronas deficientes y así corregir el defecto bioquímico por cooperación metabólica. Desafortunadamente, aunque el trasplante de médula ósea en el paciente con el síndrome de Lesch-Nyhan fue un éxito, no se presentó ningún avance neurológico significativo¹²⁷.

De esta manera podemos concluir que el síndrome de Lesch-Nyhan aunque es un modelo para el desarrollo de técnicas de transferencia genica, por tenerse bien caracterizado cual es el defecto genico que lo causa, presenta serios impedimentos, el principal de ellos es el poco conocimiento que se tiene de la relación entre el nivel de caracterización del defecto genico y los efectos neuropatológicos resultantes. Aún hay mucho por saber, antes de poder establecer una Terapia Genica definitiva para este síndrome¹²⁸.

ENFERMEDADES ADQUIRIDAS

El término de Terapia Génica fue empleado originalmente para describir tratamientos dirigidos a desordenes genéticos que consistían en reemplazar el gen defectuoso por su contraparte normal. Sin embargo, los investigadores han encontrado en esta terapia un amplio rango de aplicación en otras áreas, que incluyen cáncer, enfermedades infecciosas y trasplantes, por lo cual se ha requerido ampliar el concepto de Terapia Génica para incluir en éste a todos los tratamientos que involucren una alteración genética de las células.

CÁNCER

Durante las dos últimas décadas ha habido grandes avances en el conocimiento del proceso de desarrollo del cáncer, demostrándose que el cáncer tiene bases genéticas. Esto ha ofrecido nuevas oportunidades para prevenirlo y darle un tratamiento adecuado. Por ejemplo, el hecho de conocer a tiempo, la predisposición genética a cáncer de ciertos individuos permite cambios en el estilo de vida del sujeto o bien el evitar su exposición a ciertos ambientes (humo del cigarro por ejemplo), además un diagnóstico a nivel molecular permite un pronóstico más preciso¹²⁷.

A partir de estos conocimientos, los oncólogos han podido utilizar terapias más específicas, así como desarrollar vacunas genéticas. Uno de los avances más prometedores, logrados a partir del conocimiento molecular del cáncer, es la posibilidad de emplear a la Terapia Génica para destruir selectivamente a las células tumorales. Por ejemplo, la pérdida de genes tumor-supresores como *p53* y la sobreexpresión de oncogenes como *k-ras* que han sido identificadas en un gran número de tumores malignos, se han corregido. En el caso de *p53*, insertando una copia de este gen en las células tumorales deficientes del mismo, provocando la muerte de estas células. La sobreexpresión del oncogén *k-ras* pudo ser bloqueada a nivel genético mediante la integración de un gen antisentido, cuyo transcrito se une específicamente al RNA del oncogén, eliminando su capacidad para producir su

proteína. Estos son ejemplos de algunas de las estrategias basadas en Terapia Génica para el tratamiento de cáncer. Otras de ellas son¹²⁷:

- Incrementar la inmunogenicidad del tumor, introduciendo genes que codifiquen para antígenos inmunogénicos.
- Potenciar la actividad anti-tumoral de las células inmunes, por ejemplo mediante la introducción de genes que codifiquen para citoquinas.
- Insertar genes suicidas o sensibles en el tumor, como los genes que codifican para HSVtk (timidina cinasa del virus *Herpes simplex*).
Bloquear la expresión de oncogenes mediante la introducción de genes antisentido (ejemplo ya mencionado).
- Proteger células sáliva, de los efectos tóxicos de la quimioterapia, introduciendo genes que confieran resistencia al fármaco que se empleará.
- Insertar genes tumor supresores (otro de los ejemplos ya mencionados)
- Bloquear los mecanismos mediante los cuales los tumores evaden la destrucción inmunológica, por ejemplo introduciendo el gen antisentido para el que codifica el mensaje IGF-1 (insulin like growth factor 1)
- Eliminar células tumorales insertándoles genes que codifiquen para toxinas y que están bajo el control de un promotor tumor específico, por ejemplo el gen que codifica para la cadena A de la toxina difterica.

La Terapia Génica ha presentado un rápido avance, especialmente en el campo de la oncología (fig. 4.4). Esto se debe en parte a que las células tumorales pueden ser manipuladas *ex vivo*, mientras que los tejidos afectados de individuos con otras enfermedades genéticas generalmente no presentan esta facilidad. Además, la terapia que utiliza genes inmunestimuladores como los que codifican para interleucina 2 (IL-2) pueden ser empleados en diferentes tipos de cáncer¹²⁷.

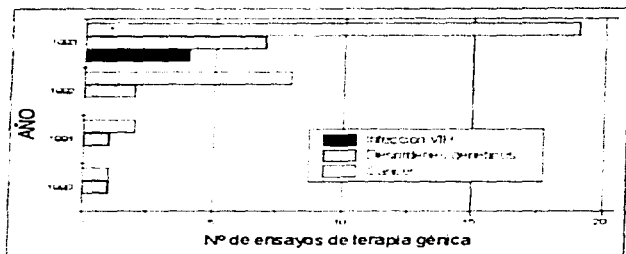


FIG. 3.1

GRÁFICA DEL INCREMENTO DE ENSAYOS EN TERAPIA GÉNICA²⁷

El número de protocolos de Terapia Génica (aprobados por el EAC) se ha incrementado considerablemente desde el primer protocolo aceptado en 1993. Hasta diciembre de 1995, había 45 protocolos aprobados en los E.U., 30 de los cuales son tratamientos contra cáncer.

Los protocolos clínicos actuales de transferencia genética en cáncer pueden ser divididos en aquellos que tienen como propósito el marcaje genético y los que su propósito es la Terapia Génica²⁸; a estos últimos son a los que se enfoca esta tesis. En los primeros las células transducidas sirven como marcadores, en un intento por entender la biología del cáncer o de la respuesta del organismo a este tipo de células. Estas células logran ser detectadas mediante técnicas muy sensibles como PCR ("Polymerase Chain Reaction"), donde una célula marcada puede ser detectada en una población de 100,000 células no modificadas²⁹. En uno de los estudios realizados, se utilizaron linfocitos tumor-infiltrativos (TIL's), marcados genéticamente, para conocer el destino de linfocitos antitumorales reinfundidos en pacientes bajo tratamiento contra melanomas malignos avanzados³⁰. Con este método, se detectaron TIL's continuamente en circulación durante 3 a 8 semanas y en biopsias de tumor, por más de 64 días. No se presentó evidencia alguna de replicación del virus en los

TIL's transfundidos, ni tampoco de infección retroviral en dichos pacientes. Es así como este tipo de transferencia genica, se ha convertido en una herramienta para la investigación más que para la Terapia Genica en si.

Por otra parte, los estudios encaminados a la Terapia Genica han dado como resultado distintas estrategias a seguir. Estas pueden ser divididas en dos grandes categorías dependiendo de cual sea el proposito del tratamiento, el de corregir genéticamente las células tumorales o bien, destruirlas¹⁸.

La terapia genica correctiva es poco factible, debido a la naturaleza de evolución del fenotipo maligno ya que la mayor parte de las células tumorales presentan múltiples mutaciones antes de ser clinicamente evidentes. Estrategias como el reemplazamiento génico o la estrategia antisentido, generalmente actúan célula por célula por lo que no generan una protección sistémica contra el tumor parental.

Por otra parte, la Terapia Genica citotóxica parece ofrecer mejores resultados que la correctiva, aunque requiere de sistemas de transferencia *in vivo* que lleven el gen terapéutico a cada célula tumoral. Sin embargo, su capacidad puede verse incrementada si el gen terapéutico codifica para un producto que logre mediar la muerte de células vecinas no transducidas, fenómeno conocido como "efecto circundante". Genes que codifican para enzimas capaces de activar un pro-fármaco tóxico son de especial importancia, por ejemplo la enzima HSVtk activa el pro-fármaco ganciclovir provocando la muerte de células cercanas a las transducidas, posiblemente debido a la transferencia de metabolitos tóxicos entre células¹⁹.

La Inmunoterapia aunque pudiera ser considerada como citotóxica, se refiere a una terapia biológica basada en una inmunomodulación genética, que estimula los mecanismos de defensa natural del huésped encargados de mediar la regresión del cáncer. Como se sabe las células cancerígenas pueden ser vulnerables al ataque inmunológico vía:

- **Modificación antigénica de la superficie de células tumorales, expresando una proteína extraña (viral o bien un antígeno del MHC)**
- **Modificación de la respuesta inmune mediante la introducción de genes que codifiquen citocinas, factores de crecimiento, etc. en las células tumorales¹²⁸.**

Una activación de la respuesta inmune antitumoral le transfiere a los componentes del sistema inmune los problemas más difíciles de superar en cualquier sistema de transferencia diseñado, la exactitud y la eficiencia. Una vez activado el sistema inmune, éste posee propiedades sumamente importantes como son especificidad y amplificación de la respuesta¹³⁰.

Aunque durante mucho tiempo la inmunoterapia resultó ser efectiva sólo contra melanoma y carcinoma renal, gracias a la transferencia genica el interés por este tipo de terapia ha resurgido. Actualmente varios grupos investigan la producción de vacunas celulares autólogas para el tratamiento y prevención del cáncer. Esto se logra mediante la remoción de células tumorales del paciente que se cultivan *in vitro* y se les insertan genes inmunoestimuladores que codifican para citocinas o moléculas del MHC¹³². Estas células son reinyectadas en el paciente en un esfuerzo por inducir una respuesta inmune sistémica que destruya las células tumorales y a la vez vacune al paciente contra un tumor recurrente. Se ha demostrado que la vacunación con células que producen citocinas produce una inmunidad sistémica en ratones y que la alteración de tumores singénicos con genes que codifican para IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , o IFN γ provoca una destrucción inmunológica de las células tumorales *in vivo*. Por ello, varios estudios de terapia en humanos han sido aprobados. En estos, los pacientes reciben células tumorales autólogas o alogénicas modificadas genéticamente llevando genes que codifican IL-2, TNF α o GM-CSF. Se han empleado en el tratamiento del melanoma, carcinoma colorrectal, carcinoma renal celular, neuroblastoma o cáncer de mama¹³³. Una modificación a esta técnica es la inserción de los genes a fibroblastos autólogos, los cuales son posteriormente mezclados con células

tumorales irradiadas y reinyectados. Esta modificación presenta la ventaja de que los fibroblastos crecen más fácilmente *in vitro* que las células tumorales.

También se ha intentado modificar genéticamente a los linfocitos T, los cuales tienen la capacidad de penetrar el tejido tumoral (conocidos como TIL's linfocitos tumor infiltrativos), de hecho muchas estrategias para Terapia Génica humana esperan explotar esta propiedad para enviar citocinas directamente a las masas tumorales. Se piensa que la secreción local de citocinas por el efecto de los linfocitos T incrementa su actividad antitumoral evitándose así, los efectos colaterales que se presentan cuando se administran las citocinas sistemáticamente. Sin embargo, los linfocitos T son difíciles de transducir con vectores retrovirales y tienden a disminuir la expresión del gen que codifica para la citocina¹²⁷.

Y finalmente, otra estrategia empleada es la inmunización genética que consiste en inmunizar al individuo contra un antígeno específico de tumor clonado, mediante la transferencia *in vivo* y expresión del gen en células musculares¹²⁸.

Sistemas de Transferencia Génica Los sistemas de transferencia que se emplean actualmente en cáncer con más frecuencia son plásmidos, retrovirus y adenovirus recombinantes. En la tabla 4.2 se presenta una comparación de estos sistemas de transferencia y sus diferentes propiedades.

PROPIEDADES DEL SISTEMA	SISTEMA DE TRANSFERENCIA GÉNICA		
	PLÁSMIDO	RETROVIRAL	ADENOVIRAL
Transferencia genica <i>ex vivo</i>	Muy ineficiente a menos que se utilice como acatizador un adenovirus	Buen lograda	Alta eficiencia aunque sin integracion
Transferencia genica <i>in vivo</i>	Buena si se inyecta directamente al tumor y forma complejos con lipidos cationicos	Mayor eficiencia mediante implantacion intratumoral	Eficiente
Eficiencia de la transferencia	Transfleccion baja en depositos pequenos	Titulos de 10^{12} /ml requiere celulas en division	10^{10} /ml. No requiere de division celular
Expresion genica	Tecido especifica o tumor especifica con promotores	Perdida parcial de la especificidad en el vector	Dificil
Estabilidad de la expresion	Transitoria, baja frecuencia de integracion	Aunque ocurre integracion, puede perderse la expresion <i>in vivo</i>	No hay integracion el DNA se pierde en poblaciones en division
Seguridad	Remota posibilidad de mutagenesis por insercion	Posibles virus cooperadores, mutagenesis por insercion	Expresion de genes virales, posibles virus cooperadores

TABLA 3.2
PROPIEDADES DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE
TRANSFERENCIA GÉNICA EMPLEADOS EN CÁNCER¹³⁰

Estrategias de Terapia Génica en Cáncer

Inmunoterapia. El primer intento por modificar células tumorales *in vivo* fue mediante una inyección directa de liposomas con el gen que codifica para el antígeno HLA-B7, el cual induce reacción inmune contra estas células. Tres pacientes fueron tratados con esta terapia, incrementando las dosis de liposomas. Uno de ellos desarrolló respuesta inmune tanto contra células de melanoma tratadas como no tratadas con liposomas¹³⁵. Estos

resultados llevaron a pensar en un posible tratamiento de vacunación contra cierto tipo de malignidades (ver Inmunoterapia pag 18).

Genes suicidas. Otra categoría de Terapia Génica para cancer implica la modificación de las células tumorales para potenciar su respuesta a la quimioterapia. El fundamento de esta estrategia es inducir la muerte de las células malignas mediante el metabolismo de moléculas tóxicas o la activación específica de profármacos, dentro del tumor¹²⁶. Un ejemplo de la misma es el gen suicida del virus *Herpes simplex*, ya mencionado con anterioridad, que codifica para una timidin cinasa (tk) haciendo las células tumorales susceptibles a ganciclovir. En la mayoría de los casos, las células transfectadas son administradas localmente en los tumores. Una posibilidad es inyectar intracerebralmente el vector retroviral y para lograr un número de partículas suficiente, emplear la línea celular productora de retrovirus (VPC's)¹²⁷. Esto nos da la ventaja de que los retrovirus no puedan transfectar células que no se estén dividiendo (neuronas en buen estado), por lo cual con la administración de ganciclovir se eliminan sólo células que contienen el gen tk (células tumorales y productoras de tk) dejando al tejido sin ningún daño. En algunos casos una erradicación completa del tumor se obtiene con sólo 10-20% de células tumorales transducidas, gracias al efecto circundante¹²⁸.

Debido a que la eficiencia de este sistema ha sido demostrada en numerosos experimentos animales y que los pacientes con tumores cerebrales recurrentes tienen un mal pronóstico, se inició el estudio clínico en humanos, en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos en diciembre de 1992. Cada uno de los 12 pacientes implicados en este estudio recibieron inyecciones múltiples de VPC's en todo el crecimiento tumoral. Una semana después comenzaron a recibir dos infusiones intravenosas de ganciclovir diarias durante 14 días. En las observaciones preliminares de 8 pacientes que tenían glioblastoma recurrente múltiple o tumores metastásicos, cinco de ellos mostraron cierto grado de respuesta antitumoral sin ninguna evidencia de toxicidad. Estos resultados han permitido la

aprobación de dos estudios clínicos más, ambos inyectando directamente el vector retroviral en los depósitos tumorales. Un grupo inyectará dos vectores retrovirales distintos en cáncer de pulmón adecuados al mecanismo responsable de la malignidad, por ejemplo un gen *p53* y un gen antisentido *K-ras*. Otro grupo inyectará un vector que codifique para IF γ (interferón gamma) directamente a depósitos de melanoma¹²².

Genes fármaco-resistentes. Otra estrategia empleada es la protección del tejido sano, por ejemplo mediante la modificación genética de médula ósea normal confiriéndole resistencia a la quimioterapia. Se ha demostrado la posibilidad de introducir el gen de la resistencia multifármaco 1 (*mdr-1*) en células tallo. Este gen ha sido aislado de células tumorales en donde su producto bombea hacia el exterior fármacos quimioterapéuticos como doxorubicina, vincristina, vinblastina, VP-16, VM-26, taxol y actinomicina-D. El problema que se presenta es que las células tumorales que se encuentren en médula ósea también se volverán resistentes al fármaco. Este tratamiento clínico ha sido aprobado para evaluar la protección que confiere a médula ósea de mujeres que están recibiendo altas dosis de quimioterapia para combatir cáncer diseminado de mama y ovarios, así como para pacientes con tumores cerebrales¹²³.

Terapia Génica directa. Cuando se lleva a cabo una terapia antígeno selectiva, ya sea contra oncogenes o de la expresión de genes tumor supresores; se depende totalmente de una completa transducción de las células tumorales, ya que si al menos una célula no es modificada, esta continuará creciendo¹²⁴.

La tecnología antisentido modifica la expresión génica bloqueando selectivamente la producción de proteínas relacionadas con la enfermedad. Esto lo logra mediante la inhibición de los mRNA y mediante esta estrategia se ha logrado la inhibición de oncogenes, la inducción a apoptosis, un mayor efecto de la quimio y radioterapia y la interrupción de la

supresión inmune. Clínicamente los oligonucleótidos antisentido han sido empleados *ex vivo*, regional o sistémicamente. Por ejemplo en el trasplante autólogo de médula ósea en tumores sólidos o hematológicos, los oligonucleótidos antisentido ayudan a purgarlos. En el caso de tumores intracraneales ayudan a minimizar los efectos tóxicos colaterales¹⁵⁶.

Las ribozimas por su parte, son una atractiva terapia a futuro, ya que son capaces de reconocer moléculas de RNA de una célula específica y degradarlas, por ello su efecto puede ser más duradero que el de oligonucleótidos. Un ejemplo es la inhibición de la expresión del gen *mdr-1* en cultivos celulares de mesotelioma por ribozimas específicas¹⁵⁷.

Tratamientos Clínicos para Cáncer Aprobados por el RAC

En base a los resultados obtenidos en los estudios ya mencionados, existen varios tratamientos terapéuticos ya aprobados en humanos, en los cuales los pacientes son inyectados con células tumorales modificadas genéticamente, ya sea autólogas o alogénicas. Algunos de estos tratamientos, así como el número de Instituciones en los Estados Unidos que ya los aplican se mencionan en la tabla 4.3.

Los protocolos aprobados de Terapia Génica para cáncer o en proceso de aprobación, incluyen la modificación genética *ex vivo* de linfocitos T, células tumorales y células tallo lo cual no representa problema con los avances tecnológicos que va se tienen. El obstáculo a superar en este tipo de Terapia Génica como en otras, es el diseño de sistemas de transferencia con mayor precisión y eficiencia, sobre todo en el acceso a los depositos primarios o metastásicos de células tumorales. Hasta ahora, los únicos vectores que tienen esta propiedad son los retrovirales, por lo que se debe poner un mayor empeño en el control de su ciclo replicativo para poder restringir su tropismo a una categoría específica de células tumorales y de este modo, lograr un vector más seguro y eficiente.

Tipo de cáncer	Tejido	Gen codificante	No. de centros participantes
Tumores cerebrales	celulas tumorales	HSVtk*	6
	celulas tumorales	IGF-1 antisentido	1
	HSC's	MDR-1	1
Cáncer de mama	fibroblastos	IL-4	1
	HSC's	MDR-1	2
Cáncer colorrectal	celulas tumorales	IL-2 o TNF	2
	fibroblastos	IL-2 o IL-4	2
	celulas tumorales	HLA-B7 y b2-microglobulina ^b	1
Melanoma maligno	celulas T	TNF	1
	celulas tumorales	TNF o IL-2	6
	fibroblastos	IL-4	1
	celulas tumorales	interferon g ^b	1
	celulas tumorales	molecula coestimuladora de B7	1
	celulas tumorales	HLA-B7 o HLA-B7 y b2-microglobulina ^b	2
Neuroblastoma	celulas tumorales	IL-2	1
Cáncer de pulmon	celulas tumorales	K-RAS ^b antisentido	1
		p53 ^b silvestre	1
Cáncer de ovarios	HSC's	MDR-1	2
	celulas tumorales	HSVtk	1
Carcinoma de celulas renales	celulas tumorales	IL-2 TNF o GM-CSF	4
	fibroblastos	IL-4	1
Cáncer de pulmon	celulas tumorales	IL-2	1
Tumores solidos	celulas tumorales	HLA-B7 y b2-microglobulina ^b	1

*HSC's, celulas tallo hematopoyeticas

^bMediante Terapia Genica *in vivo*

TABLA 4.3
TRATAMIENTOS PARA CÁNCER EMPLEANDO TERAPIA GENICA APROBADOS POR EL RACI¹⁷

SIDA

Con el descubrimiento de que el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es el causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la investigación se enfocó al entendimiento de los mecanismos del ciclo infeccioso viral y a su patogénesis. Este ciclo viral se encuentra ilustrado de una manera sencilla en la figura 4.5. El estudio de dichos mecanismos ha permitido identificar algunos blancos moleculares para el desarrollo de antivirales que incluyen inhibidores de la transcriptasa reversa, competidores por los sitios de entrada virales a la célula, vacunas, inhibidores de proteasas y el nuevo grupo de los antivirales génicos. Estos antivirales difieren de los tradicionales porque son transferidos como DNA o RNA en las células y afectan sus blancos intracelulares ya sea en la fase temprana del ciclo infeccioso (que comprende desde la penetración del virus a la célula hasta el sobrelapamiento que presenta su genoma después de ser transcrito) o en la fase tardía (a partir de la traducción del genoma viral hasta la salida de la nueva progenie viral, ver fig. 4.5) Además, ofrecen la ventaja de poder atacar al virus simultáneamente en diferentes loci minimizando su poder de resistencia¹⁷. Las nuevas estrategias desarrolladas con estos antivirales pueden encaminarse a la inmunización intracelular, donde la finalidad es conferirles a las células resistencia a la replicación y expresión viral y limitar la diseminación del virus en el individuo infectado; o bien a una estrategia totalmente inmunológica, donde se trata de potenciar la inmunidad antiviral usando células genéticamente modificadas que expresen productos génicos virales para inducir la respuesta celular inmune¹⁸.

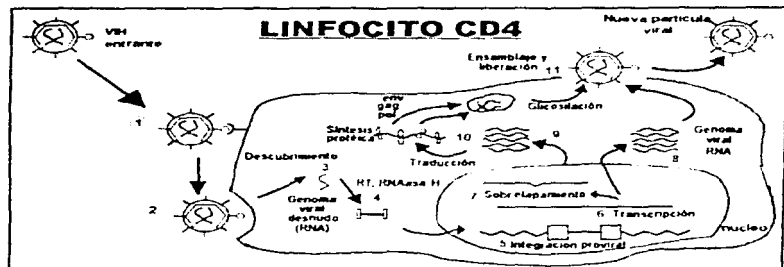


FIG. 1-5

CICLO DE REPLICACION DEL VIH Y ESTRATEGIAS DE INHIBICION

El virus está compuesto por un "core" que contiene dos cadenas semillenas idénticas de RNA y proteínas virales. Esta nucleóide está rodeada por una envoltura que se deriva de la membrana celular y la adquiere al salir de la célula. La penetración depende de interacciones entre la molécula viral gp120, el receptor celular CD4(1), después del descubrimiento(2), el RNA es transcrita inversamente a DNA(4) el cual entra al núcleo y forma el complejo de integración proviral(5). El DNA viral integrado llamado provirus sirve como molde para la transcripción(6). El transcrita viral se transporta a citoplasma via vta para ser de genoma viral(8) o permanece en núcleo donde una serie de sobrelapamientos(7) dirigidos por el gen viral *pes* generan mRNA(9) empleados en la traducción(10). Las proteínas virales sintetizadas junto con transcritos de RNA sin sobrelaplar forman "nucleos" los cuales adquieren su envoltura al pasar por la membrana celular.

PASOS

1. Interacciones virus receptor
2. Penetración/descubrimiento
3. Genoma viral desnudo
4. Transcripción inversa
5. Integración proviral
6. Transcripción
7. Sobrelapamiento
8. Síntesis *de novo* de mRNA viral
9. Síntesis *de novo* de mRNA genómico
10. Traducción
11. Ensamble

ESTRATEGIA DE INHIBICION

CD4 soluble
anti-gp 120 intracelular
ribosomas (Rz-1)

nucleos TAR
RNAs antisentido
nucleos RRE
Rz-2
Rz-3
RNAs antisentido
fusones nucleasa-gag, Rz-4

1-8 SELEX
GSE

Inmunización Intracelular Esta estrategia puede emplear tres tipos de moléculas: ácidos nucleicos, los cuales compiten con el DNA viral (vDNA) por los sitios de enlace a proteínas reguladoras esenciales para HIV; proteínas intracelulares, las cuales compiten o interfieren con las funciones virales normales; y toxinas o moléculas tóxicas que eliminan células huésped que se encuentren infectadas por el virus¹³⁷. En cada uno de los casos mencionados el beneficio terapéutico recibido estará determinado por:

- el gen antiviral elegido
- la expresión intracelular alcanzada y su estabilidad
- el sistema de transferencia
- células y tejidos blanco
- y la localización del producto genico en el compartimento celular apropiado

Una cuestión importante es que la estrategia no debe ser afectada por la variación genética del virus¹³⁸.

Estrategias basadas en ácidos nucleicos En este tipo de estrategias se utilizan supresores basados en RNA como son sensores de RNA ("RNA decoys"), ribozimas y genes antisentido.

Los sensores de RNA son pequeñas secuencias de RNA que compiten con los RNA virales por el enlace a proteínas reguladoras de HIV que se requieren para la replicación del virus como son tat y rev. A diferencia de las ribozimas o los RNA antisentido, los sensores de RNA parece ser que no se ven afectados por la variabilidad del virus debido a que su blanco son secuencias altamente conservadas. La actividad antiviral de pequeñas secuencias TAR fue probada *in vitro* usando un sistema de transferencia retroviral. La replicación viral en líneas celulares humanas que expresaron el sensor TAR se redujo por más de 30 días¹³⁹. Similarmente se presentó una inhibición prolongada del virus al expresarse el sensor RRE, sin embargo, este último ha mostrado ser más efectivo en la prevención de la replicación¹⁴¹.

El problema que se presenta con estos señuelos es la posibilidad de que factores celulares se asocien a estas estructuras y sean secuestrados en células con una sobreexpresión de señuelos de RNA. Por esta razón los señuelos derivados de RRE tienen la ventaja de corresponder a un dominio de enlace mínimo de sólo 13 nucleótidos que no se asocia con factores celulares y es capaz de bloquear la actividad de rev sin unirse a factores celulares¹⁴².

Otro de los supresores utilizados en Terapia Génica contra SIDA son las ribozimas que han sido diseñadas para unirse y cortar secuencias específicas del RNA viral y de esta manera inactivar varios genes al mismo tiempo. De este modo aunque se perdiera uno de los sitios de la ribozima debido a mutaciones, se asegura la inactivación del RNA viral. El primer estudio *in vitro* con ribozimas contra HIV, empleó ribozimas dirigidas contra la secuencia gag obteniéndose líneas celulares resistentes a varios HIV aislados y una actividad inhibitoria considerable por más de 35 días¹⁴³. Cabe hacer notar que la ribozima actúa tanto a nivel del RNA sintetizado *de novo* (fig. 4.5, Rz-2 y Rz-3) como en el RNA del HIV entrante (fig. 4.5, Rz-1).

Los genes antisentido producen oligonucleótidos de RNA que se enlazan a su RNA blanco inhibiendo la traducción o bien induciendo la degradación de RNA's dúplex (Fig. 4.5, paso 10). Tanto RNA's antisentido como ribozimas, pueden ser introducidos en la fase temprana de la infección y actuar enlazándose al RNA entrante antes de que se complete la transcripción reversa. Como durante la viremia del HIV, el número de partículas que penetran a la célula es bajo, es más efectiva la estrategia aplicada en este momento, durante la fase temprana. Esto fue demostrado *in vivo* utilizándose oligonucleótidos antisentido, además existe evidencia también de la eficiencia de moléculas antisentido agregadas tempranamente a células, en una infección aguda en dosis 10 a 100 veces menores que las requeridas en cultivos infectados crónicamente¹⁴⁴.

Existen tres factores intracelulares que afectan la función tanto de ribozimas como RNA's antisentido y son: la co-localización del blanco y moléculas efectoras, estructuras

secundarias del RNA blanco y los enlaces RNA-proteína. En el primer caso se conoce poco sobre las condiciones intracelulares que tienen influencia directa en la formación del dúplex molécula efectora/blanco. En un estudio reciente se encontró que para alcanzar 50% de hibridación de los RNA sentido se requiere de niveles 600 a 2,800 veces más altos de los RNA antisentido. Además existen compartimentos celulares por lo que, no existe ninguna garantía de que el blanco y los RNA's efectores se dirijan al mismo compartimento celular⁴⁵. Por ello se han implementado métodos que dirigen tanto blanco como ribozimas al mismo sitio subcelular⁴⁶.

Las estructuras secundarias del RNA blanco se refieren a un doblamiento físico que impide el enlace o corte del RNA debido a que estos sitios de enlace se encuentran escondidos en la molécula. Se han empleado programas de computación que simulan las estructuras secundarias que probablemente se forman, sin embargo, no se sabe mucho acerca de que es lo que determina la formación de estas estructuras *in vivo*⁴⁷.

También dentro de las células, los RNA's se encuentran unidos a ciertas proteínas, en el caso del HIV, muchos de sus RNA's reguladores se encuentran asociados a estas proteínas. A pesar de que no existe evidencia directa de interferencia, la unión de estas proteínas al RNA viral puede cambiar la habilidad de las ribozimas y los RNA antisentido para reconocer sus blancos. Esta influencia en la actividad de las ribozimas ha sido documentada recientemente, por lo cual es importante la caracterización de estos sitios de enlace para llevar a cabo una selección adecuada de los blancos a alcanzar tanto por los RNA's antisentido como por las ribozimas⁴⁸.

Estrategias basadas en proteínas Otra de las estrategias utilizadas para la inhibición de la replicación del HIV se basa en la expresión de proteínas del HIV alteradas que tienen un fenotipo transdominante mutado (TD) y que compiten con las proteínas nativas virales dentro de la célula. En general las mutantes TD tienen alterados sus

dominios funcionales, pero conservan sus dominios de enlace. Algunos ejemplos de estos mutantes son las formas alteradas de *gag*, *env*, *rev* y *Tat*¹²¹.

Las formas mutantes TD de *gag* resultaron ser efectivas, ya que como se esperaba limitaron la replicación de HIV mediante la interferencia en el correcto ensamblaje del "nucleo" viral incluso con una baja expresión¹²². Sin embargo, se han presentado dificultades en la estabilidad de estas proteínas debido a los múltiples elementos presentes en la secuencia de *gag*¹²¹. Los mutantes *Tat* han mostrado ser efectivos solo en niveles altos de expresión¹²². El mutante TD más avanzado experimentalmente hasta la fecha es la proteína mutante de *rev* conocida como revM10, este retiene dos de las funciones de *rev* su habilidad para unirse a RRE en el genoma viral y su habilidad para formar multímeros de *rev*, pero es incapaz de ejercer su papel regulador en el transporte de RNA's virales del nucleolo al citoplasma¹²³.

Otras estrategias que limitan la replicación del HIV utilizan variantes CD4 que se unen y secuestran a los viriones dentro de la célula¹²⁴ o bien la expresión de un gen celular interferón inducible cuyo producto se une a RRE interfiriendo con la función de *rev*¹²⁵. Una estrategia más se basa en la utilización de anticuerpos intracelulares que secuestran las proteínas virales o bien que se unen a la envoltura del HIV¹²⁶.

Estrategias basadas en toxinas o moléculas tóxicas Las toxinas representan otra alternativa para prevenir la diseminación del virus. A diferencia de otras estrategias, las toxinas no protegen a las células, de hecho, destruyen las células infectadas previniendo de esta manera la liberación de la progenie viral. Un ejemplo ilustrativo es el gen que codifica para la toxina de la difteria A (DT-A) la cual es una potente inhibidora de la síntesis proteica en células eucariotes. En uno de los experimentos realizados DT-A es colocada bajo el control del LTR del HIV y el gen híbrido es transferido a células adecuadas. La infección de estas células mediante la entrada del virus productor de *Tat* provoca la activación de la toxina y la muerte celular¹²⁶.

Estrategia Inmunológica El más claro ejemplo de una estrategia totalmente inmunológica es la fabricación de vacunas basadas en ácidos nucleicos que implican una transferencia genética directa de genes de HIV en el tejido de los pacientes, simulando una infección natural y por consiguiente induciendo la respuesta inmune contra el virus. Incluso plásmidos circulares de DNA libre o bien vectores retrovirales son empleados para enviar estos genes a tejidos blanco donde se sintetizan las proteínas correspondientes, se procesan y se presentan en la superficie celular como moléculas MHC clase I, favoreciéndose la producción de células T citotóxicas. Datos derivados de diversos modelos animales y con varios genes virales han confirmado que también se presenta una respuesta humoral¹⁷⁶.

PROTOSCOLOS CLÍNICOS ACTUALES

Hasta 1995 se tenían ya poco más de 100 protocolos aprobados en todo el mundo que incluyen marcaje genético y Terapia Génica aplicados en alrededor de 500 pacientes. Entre los países que utilizan clínicamente la Terapia Génica se encuentran: Austria, China, Francia, Alemania, Italia, los Países Bajos, Suecia, Inglaterra, Suiza y los Estados Unidos. En la tabla 4.4 se muestran algunos de estos protocolos ya aprobados que incluyen Terapia Génica para diversas enfermedades hereditarias como fibrosis quística, e hipercolesterolemia familiar, empleando diversas células blanco¹.

Por otra parte, enfermedades adquiridas como cáncer y SIDA, que representan más de 80% de los protocolos clínicos en desarrollo, requieren de una Terapia Génica que abarque: regulación de la respuesta inmune, eliminación selectiva de células, inhibición de oncogenes o expresiones virales y protección de los tejidos normales contra los efectos tóxicos de la quimioterapia. En México, se han iniciado los primeros estudios en este campo, aunque aun se encuentran en la fase experimental; tal es el caso del protocolo que se está realizando en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México¹⁷⁷.

DISORDEN	OBJETIVO	TIPO(S) DE CELULO(S)	VECTORES EMPLEADOS	FECHA DE APROBACION NIH/PRIMER PACIENTE TRATADO	PAISES QUE LO APLICAN
deficiencia de ADA	reemplazo de ADA	sangre	retrovirus	6/9/90*	Italia, Países Bajos, E.U.
deficiencia de α -1-antitripsina	reemplazo de α -1-antitripsina	epitelio respiratorio	liposomas	pendiente	E.U.
SIDA	presentación de Ag's e inactivación de HIV	sangre y médula	retrovirus	19/4/94*	E.U.
cancer	potenciación de la respuesta inmune	sangre, médula y tumor	retrovirus, liposomas, electroporación,	5/2/93* 9/9/93	Austria, China Francia, E.U., Alemania, Países Bajos
	destrucción del tumor	tumor	retrovirus, DNA no acorn plejado	3/9/93* 2/2/94	E.U.
	quimio protección	sangre y médula	retrovirus	2/12/93*	E.U.
	marcage de células tumorales	sangre, médula y tumor	retrovirus	14/1/92*	Canada, E.U., Francia/Suecia
fibrosis quística	reemplazo de la proteína cfr	epitelio respiratorio	adenovirus liposomas	26/8/93* 3/9/93 26/8/93	E.U. Inglaterra
hipercolesterolemia familiar	reemplazo de los receptores de LDL	hígado	retrovirus	14/11/91* 5/6/92	E.U.
anemia de Fanconi	transferencia génica del grupo C complementario	médula y sangre	retrovirus	12/7/94*	E.U.
enfermedad de Gaucher	reemplazo de glucocerebrosidasa	sangre y médula	retrovirus	3/9/93*	E.U.
hemofilia B	reemplazo del factor IX	fibroblastos de piel	retrovirus	2/12/91	China
artritis reumatoide	transferencia de citoquinas	sinovium	retrovirus	pendiente	E.U.

TABLA 4-4

ALGUNOS PROTOCOLOS CLINICOS DE TERAPIA GENICA APROBADOS (1990-1994)

A pesar de los avances en la Terapia Génica, todavía no se producen resultados definitivos. Hay evidencias de la eficacia de algunos de ellos como es el caso de la Terapia Génica aplicada a SCID e hipercolesterolemia familiar. Esto es importante no sólo por brindar una opción mas de terapia, sino porque también estimula una continua investigación hacia nuevos campos de la medicina¹.

Durante los sesentas y los setentas los científicos y estudiosos de la ética se enfrentaron al nuevo concepto de la Terapia Genica Humana y debatieron situaciones abstractas. Estos debates siguieron dos corrientes: por una parte se tenían visiones utópicas de que dicha terapia sería el medio de salvación para toda enfermedad e imperfección genética; mientras que la corriente opuesta tenía una visión apocalíptica de la misma la cual llevaría al fin de la humanidad. La evolución de las investigaciones y discusiones éticas sobre la Terapia Genica tuvo sus bases en el Código Nuremberg, y fue enriquecida por el Plan de Acción de Servicios Públicos para la Salud de los Estados Unidos en 1966¹²⁰. A partir de este año el progreso alcanzado gracias a los continuos debates éticos y la participación interdisciplinaria y pública, ha sido sorprendente. Con excepción de dos casos, la investigación y los procedimientos que ha seguido la Terapia Genica humana han sido adecuados.

El primero de estos casos se presentó cuando el científico americano Stanfield Rogers, al observar que los investigadores que trabajaban con el virus SPV ("shope papiloma virus") mantenían bajos niveles de arginina en suero, intentó junto con Terheggen quien describió el caso, aminorar el retraso mental de 3 pacientes que presentaban hiperarginemia (2 hermanas de 18 meses y 5 años y otro paciente no relacionado) inyectándoles el virus. Los resultados obtenidos no fueron favorables¹²¹. En 1971 este caso fue debatido en la Primera Conferencia Ética de Terapia Genica Humana. A pesar de que aun se desconocía el riesgo de cáncer que presenta este virus, en la misma conferencia Ramsey y otros criticaron fuertemente la injustificada acción de Rogers al tratar también a la niña mayor, quien ya

padecía un retraso mental profundo e irreversible, además de que se consideró esta acción una violación al requerimiento de informar y obtener un consentimiento del voluntario, previo a la experimentación¹⁷⁷.

Tiempo después, en 1980 Mercola y Cline* llevaron a cabo la primera Terapia Génica humana intentando tratar una β -talasemia mediante la transfección con fosfato de calcio del gen de la β -globina en células de la médula ósea. Su protocolo carente de una apropiada revisión tanto ética como científica, fue considerado prematuro y criticado también. No obstante, el trabajo de Mercola y Cline dio lugar a nuevas discusiones entre los científicos que tuvieron un resultado de suma importancia: el surgimiento de comités integrados por médicos, científicos, abogados y representantes públicos que evaluaran la seguridad y los aspectos éticos de los nuevos estudios clínicos concernientes a Terapia Génica. Es así como investigadores del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) forman el NIH "Recombinant DNA Advisory Committee"(RAC)¹.

El grupo de trabajo en Terapia Génica Humana, el cual es un subcomité interdisciplinario del RAC elaboró en 1984 un documento llamado "Puntos a considerar en el diseño y sometimiento de Protocolos de Terapia Génica Somática Humana Celular" (Points to Consider in the Design and Submission of Human Somatic Cell Gene Therapy). Estos puntos reflejan el consenso nacional e incluso internacional en las áreas más importantes concernientes a la Terapia Génica Humana. Los principales puntos de este documento¹⁸⁰ son:

- objetivos y razones fundamentales de la investigación propuesta
- Diseño de la investigación, anticipando riesgos y beneficios: i) estructuras y características del sistema biológico, ii) estudios preclínicos, iii) procedimientos clínicos incluyendo el monitoreo del paciente, iv) consideraciones de salud pública, v) calificaciones de los investigadores y suficiencia de facilidades

- selección de los pacientes
- informe del consentimiento
- privacidad.

Este grupo de trabajo incluye: tres científicos de laboratorio, tres clínicos, 3 éticos, tres procuradores, dos especialistas en política y un miembro de la ley. Este documento representa un intento por recopilar y resumir 15 años de discusiones éticas, artículos, reportes y libros publicados en los EU y Europa.

Fue hasta 1989 que las autoridades federales permitieron por primera vez el uso de un vector retroviral en humanos. Este experimento realizado en el Centro Clínico del NIH tuvo una total aprobación del RAC y de su subcomité y consistió en insertar *ex vivo* un marcador genético a los TIL's de un paciente de 52 años de edad con melanoma maligno¹²⁷. De este modo se demostró que la transferencia genética podía ser segura, en caso de que se presentase algún problema las células podían ser retiradas del torrente sanguíneo y que los TIL's marcados genéticamente pueden ser utilizados para entender mejor como atacan estas células al cáncer. Finalmente en 1990 fue aprobado el primer experimento terapéutico de Terapia Génica Humana. A una paciente de 4 años de edad con deficiencia de adenosin deaminasa se le reinfundieron sus linfocitos T corregidos mediante la inserción de una copia normal del gen ADA. El experimento tuvo el éxito esperado; Ashanti DeSilva, quien antes de ser tratada padecía enfermedades serias y persistentes debido a que su sistema inmune se encontraba débil y muy deteriorado, gracias a la terapia su respuesta inmune mejoró notoriamente y meses más tarde comenzó a llevar una vida normal¹²⁸.

Estos procedimientos de evaluación de los estudios en Terapia Génica dieron confianza al lograrse este resultado. En la actualidad, los nuevos protocolos son revisados bajo los reglamentos sobre protección de humanos en la investigación de Departamentos de Salud y Servicios Humanos. Además en el caso de EU, los Institutos Nacionales de Salud han anunciado que cualquier experimento federal, basado en Terapia Génica que involucre

DNA recombinante después de ser revisado por el RAC, debe estar aprobado por el NIH. Previo a su aprobación por el RAC, este debe ser recibido e inspeccionado por un grupo de trabajo del RAC especializado en Terapia Génica. La FDA ("Food and Drug Administration") también reglamenta el uso del DNA en estudios humanos ya que este es considerado un fármaco biológico¹⁰.

En el caso específico de enfermedades neurológicas, Juengst propuso normas a las cuales los investigadores tienen que responder. Principalmente son 4 las consideraciones éticas dirigidas a prevenir o reducir el retraso mental:

1. El beneficio clínico del paciente
2. Una participación voluntaria con previa información
3. Una selección adecuada del sujeto de estudio
4. Una seguridad biológica al enfrentarse con la incertidumbre genética.

Respecto a la seguridad del paciente, este sólo puede ser tratado si aún no presenta un daño cerebral irreversible, por esta razón muchos de los pacientes implicados en protocolos de Terapia Génica Humana son recién nacidos o niños. Las primeras enfermedades candidatas para Terapia Génica, de acuerdo al Instituto Nacional Infantil de Salud y Desarrollo Humano (NICHD), son: enfermedades de almacenamiento lisosomal como síndrome de Hurler o de Hunter y desórdenes del ciclo de la urea, como la deficiencia de ornitina transcarbamilasa. Otras que también pueden ser consideradas debido a que causan retraso mental y el gen responsable de la enfermedad ya ha sido clonado son: fenilcetonuria, síndrome de Lesch-Nyhan, homocistinuria, galactosemia, enfermedad de Tay Sachs y adrenoleucodistrofia¹⁷.

La segunda consideración ética trata de la planeación de un proceso para obtener, cuando esto sea posible, el consentimiento voluntario del niño, una vez que le ha sido explicada la razón de su tratamiento. La Comisión Nacional para la protección de Humanos en la Investigación recomienda que este consentimiento sea requerido para niños de 7 años

en adelante y que su objeción sea tomada en cuenta a menos que el proyecto traiga un beneficio directo muy importante en la salud del niño y que esta sea la única alternativa para alcanzarlo. En el caso de recién nacidos o niños muy pequeños es suficiente el consentimiento de sus padres para fines legales y éticos¹⁷⁷.

Una selección justa y adecuada es la tercera consideración ética que debe tener el investigador ya que debe estar consciente de que al tratar pacientes con enfermedades de baja incidencia podría estar tratando a todos los pacientes de una gran región que padecen esa enfermedad. Existen además condiciones económicas y sociales que tienen una gran influencia en la selección del paciente ya que en el caso de enfermedades con una baja incidencia, se tiene un gran desequilibrio entre el costo del protocolo de Terapia Génica y la cantidad de pacientes candidatos a este tratamiento. Es por ello que el papel del NIH es crucial en la compensación de este balance económico y social. Se espera que si la Terapia Génica Humana prueba ser exitosa, sus costos logren ser accesibles a los pacientes que la requieran¹⁷⁸.

La Terapia Génica somática enfrenta cuestiones éticas como es la continua comparación que se hace entre los beneficios y daños que esta terapia puede causar, por ello se evalúan que las tasas de morbilidad y mortalidad que se asocian con la enfermedad. Se ha llegado a la conclusión de que en los casos donde esta terapia es una opción terapéutica más, es recomendable solo en los casos donde ya han sido probadas otro tipo de terapias sin ningún éxito¹⁷⁹.

En el caso de la Terapia Génica en células germinales se presenta una controversia mucho mayor, ya que aún no se decide si este tipo de terapia sea ética o no. Hasta la fecha solo ha sido utilizada como una importante herramienta en la creación de animales transgénicos que permiten el estudio de ciertos desordenes. El punto de discusión en este caso es que se estaría hablando ya de una manipulación en la línea germinal que podría producir un daño irreparable no solo a todas las células de ese individuo sino también a las

de sus futuras generaciones. Es importante no olvidar que la medicina es una ciencia inexacta y que aún es muy poco lo que se entiende sobre el total funcionamiento del cuerpo humano, muchos de los intentos bien intencionados por tratar una enfermedad dentro de la terapéutica ya aprobada han llegado a producir problemas inesperados meses e incluso años más tarde, además existe un alto riesgo de producir un evento mutagénico en la línea germinal al insertarse el gen normal¹⁹.

Junto con los argumentos médicos se encuentran muchos otros argumentos filosóficos, éticos y teológicos. Algunas de las cuestiones que se formulan es si un nuevo ser humano tiene el derecho a heredar un genoma no manipulado, y si el concepto de "consentimiento" con una previa información tiene alguna validez en pacientes que ni siquiera existen aún. ¿En que punto se está cruzando la línea donde el hombre comienza a jugar un papel de Dios?. La realidad es que no puede ser considerada la Terapia Génica en líneas germinales, porque aun falta mucho por aprender de la Terapia Génica somática. Solo hasta que los estudios animales demuestren que se trata de una terapia segura y confiable para cualquier procedimiento y el público haya sido educado respecto a las implicaciones de los procedimientos, podremos pensar en comenzar a desarrollar una Terapia Génica germinal enfocada a la corrección de defectos genéticos que causen enfermedades y no a la alteración genética para un supuesto mejoramiento de las características físicas deseadas, ya que estaríamos utilizando a la genética para un daño mas que un beneficio²⁰.

Por otra parte comercialmente las compañías orientadas a la biotecnología parecen no estar aún interesadas en los avances alcanzados en la Terapia Génica. Se espera que en un futuro cada grupo de investigación implicado en una Terapia Génica específica tenga sus propias combinaciones vector-gen para llevar a cabo sus propositos, y es posible que para entonces surja un interés comercial en la producción de estuches vector-gen para determinadas enfermedades, aunque es muy posible que, dada la baja frecuencia sobre todo de ciertas enfermedades congénitas, los costos de los estuches sean elevados debido a la poca

demanda de los mismos. No obstante, si comparamos el costo de un transplante de corazón (alrededor de 90,000 dls. en 1983 en los E.U.), la intensa labor que se requiere realizar en un transplante de medula ósea, o bien las frecuentes hospitalizaciones a las que se somete un paciente con fibrosis quística para recibir tratamiento; la Terapia Génica, al mejorar la calidad de vida de los pacientes se convierte en el método más efectivo para el tratamiento de enfermedades genéticas recesivas y en algunos casos también para enfermedades adquiridas.

CONCLUSIONES

1990

Mediante este trabajo se llevo a cabo una revisión extensa de los fundamentos de la Terapia Génica así como de sus aplicaciones en diversas ramas de la medicina.

Esto nos permitió conocer las estrategias posibles de emplear y las limitaciones que se presentan para cada enfermedad en particular. Por otra parte se concio el seguimiento correcto que debe tener todo estudio clínico que involucre al ser humano y reconocer la importancia ética y moral del mismo.

Por consiguiente y de acuerdo a la información englobada en esta tesis, podemos concluir que la Terapia Génica es una disciplina que aun requiere de mucha investigación para que pueda ser considerada segura y eficiente. Sin embargo, con los pasos agigantados que las innovaciones tecnológicas permiten dar a la investigación se puede esperar que esta terapia logre alcanzar su utilización en gran parte de las enfermedades genéticas y adquiridas.

Es posible predecir, debido al número de casos que se han presentado en varios desórdenes genéticos, que su costo para estas enfermedades se mantendrá elevado, pero a pesar de ello, es importante distinguir que al menos va a ser con un tratamiento y por que no, con una cura efectiva contra estas enfermedades. En el caso de enfermedades adquiridas existe una mayor posibilidad de que los costos con esta terapia sean accesibles ya que el número de pacientes con estos padecimientos, como es el caso de cáncer y SIDA, va en aumento, por lo cual estos problemas toman cada vez mayores dimensiones.

Se puede considerar que la Terapia Génica es por hoy, la promesa más cercana a la tan esperada bala mágica y sobre todo la única esperanza de una mejor calidad de vida para muchos seres humanos. Por ello, es aquí donde radica la importancia de los logros que se puedan alcanzar en este campo.

FALTA PAGINA

No. 115

- ¹ Dube I.D., Courtney D: Gene therapy: here to stay. *Can Med Assoc J* 1995; 152: 1605-1613.
- ² Crow J.F: 60 years ago-the International Congress of Genetics. *Genetics* 1992; 131:761-768.
- ³ Coxman L.S. and Gilman A.: The pharmacologic basis of the therapeutics. Micmillan publishing Co., New York 1975. pp. 24.
- ⁴ Wolff J.A., Lederberg J: An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 1994; 5:649-480.
- ⁵ Zinder N.D., Lederberg, J: Genetic exchange in Salmonella. *J Bacteriol* 1952; 64:679-699.
- ⁶ Davis B.D: Prospects for genetic intervention in man. *Science* 1970; 170:1279-1283.
- ⁷ Spradling A.C., Rubin G.M: Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 1982; 218:348-353.
- ⁸ Hammer R.D., Palmiter R.L: Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature* 1984; 311:65-67.
- ⁹ Anderson W.F: Prospects for human gene therapy. *Science* 1984; 226:401-408.
- ¹⁰ Mercola K.E., Stang H.D., Browne J., Stiser W., Cline M.L: Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science* 1980; 208: 1033-1035.
- ¹¹ Anderson W.F: Gene therapy. *Scientific American* 1995; 273:124-128.
- ¹² Ledley F.D: Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther* 1995; 6:1129-1144.
- ¹³ Mulligan K.C: The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926-931.
- ¹⁴ Emery E.H., Malcolm S: An introduction to recombinant DNA in medicine, 2nd ed. Wiley, England 1995. 161-175.
- ¹⁵ Kuan Yee J: Prospects for using retroviral vectors for human gene therapy. *AIKD Research Review* 1995; 1:14-18.
- ¹⁶ Panganiban A.T, Terin H.M: Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNAs. *Cell* 1984; 36:673-679.

-
- ¹⁷ Markowitz D, Goff S, Vanik A: A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 1988; 62:1120-1124.
- ¹⁸ Miller A.D: Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992; 357:455-460
- ¹⁹ Sharma S, Tezler J.R: Development of adenovirus vectors for gene therapy. *MRIID Research Reviews* 1995; 1:19-26.
- ²⁰ Fields B. et al., *Fields Virology*. 2th Ed. Edit. Raven Press, USA 1990, pp. 1680-1708.
- ²¹ Hermonat P.L: Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus rep78 transformation suppressor product. *Cancer Res* 1991; 51:3373-3377.
- ²² Im D.S, Muzyczka N: The VAA origin binding protein is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 1990; 61:447-457.
- ²³ Flotte T.R, Carter B.J: Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 1995; 2:357-362.
- ²⁴ Liebert M.A: Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 1994; 5:793-801.
- ²⁵ Kotin R.M. et al: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2211-2215.
- ²⁶ Atlas R.M: Microbiología, fundamentos y aplicaciones. CECSA, Mexico 1990. 426-428.
- ²⁷ Johnson P. et al: Cytotoxicity of a replication-defective mutant of Herpes simplex virus type 1. *J. Virol* 1992; 66:2952-2965.
- ²⁸ Loyter A., Scargos G.A., Ruddle F.H: Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:422-426.
- ²⁹ Kawai S, Nishizawa M: New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1984; 4:1172-1174.
- ³⁰ Capecchi M: High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980; 22:479-488.
- ³¹ Cheng L, Ziegel Hoffer P.R., Yang N.S.: *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4455-4459.
- ³² Burkholder J.K., Decker J., Yang N.S.: Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primaty cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J. Immunol Methods* 1993; 165:149-156.
- ³³ Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., et al: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 7413-7417.

- ⁵⁴ Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., et al: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; 169:2550-2561.
- ⁵⁵ Katō K., Kanda Y., Sakurai M., Sakanishi M., Okada Y.: Direct injection of hepatitis B virus DNA into liver induced hepatitis in adult rats. *J Biol Chem* 1991; 266: 22071-22074.
- ⁵⁶ Kaneda Y., Iwai K., Uchida T., et al: Increased expression of DNA cotransduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 1989; 243: 375-378.
- ⁵⁷ Wu G.Y., Wu C.H: Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; 262:4429-4432.
- ⁵⁸ Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotten M., et al: Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3655-3659.
- ⁵⁹ Rutz J.E., Bruno M.K., Ciriole P.J., Glasser S.W., et al: Utilization of modified surfactant-associated protein B for delivery of DNA to airway cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2547-2551.
- ⁶⁰ Blumenthal K., Seth P., Willingham M.C., Pastan I.: pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry* 1984; 23: 2231-2237.
- ⁶¹ Cotten M., Langle Rouault F., Kirlappos H., Wagner E., et al: Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4033-4037.
- ⁶² Cristiano R.L., Smith L.C., Woo S.L., et al: Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2122-2126.
- ⁶³ Wagner E., Flank C., Zatloukal K., Cotten M., Birnstiel M.L.: Influenza virus hemagglutinin HA-2 n-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7934-7938.
- ⁶⁴ Parente R.A., Nadasdi L., Subbarao N.K., Szoka F.C., Jr.: Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicles: role of amino acid sequence. *Biochemistry* 1990; 29:8713-8719.
- ⁶⁵ Dubensky T., Campbell V.A., Villareal L.P.: Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:7529-7533.
- ⁶⁶ Davis H.L., Michel M.L., Mancini M., Schleef M., Whalen R.G.: Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994;

- ⁴⁷ Raz E., Carson D.A., Parker S.E., Parr T.B., et al: Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9519-9523.
- ⁴⁸ Wolff J.A., Williams P., Aesadi G., Jiao S., et al: Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechnology* 1991; 11:474-485.
- ⁴⁹ Williams K.S., Johnston S.A., Riedy M., Devit M.J., et al: Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2726-2730.
- ⁵⁰ Tang D.C., Devit M., Johnston S.A., et al: Genetic immunization: is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356:152-154.
- ⁵¹ Vahlsing H.L., Yankauckas M.A., Sawdey M., Gromkowski S.H., et al: Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *J Immunol Methods* 1994; 175:11-22.
- ⁵² Plautz G. E., Yang Z.Y., Wu B.Y., Gao X., et al: Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4645-4649.
- ⁵³ Nabel G.J., Nabel E.G., Yang Z. Y., Fox B.A., et al: Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11307-11311.
- ⁵⁴ Nabel E.G., Yang Z.Y., Plautz G., Forough R., et al: Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362:844-846.
- ⁵⁵ Philip R., Liggitt D., Philip M., Dazin P., Debs R.: In vivo gene delivery. Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J Biol Chem* 1993; 268:16087-16090.
- ⁵⁶ Kameda Y., Iwai K., Uchida T.: Increased expression of DNA cotransduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 1989; 243:375-378.
- ⁵⁷ Wu C.H., Wilson L.M., Shalaby F., Grossman M., et al: Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J Biol Chem* 1989; 264:14338-14342.
- ⁵⁸ Wu G.Y., Wu C.H: Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* 1988; 263:14621-14624.
- ⁵⁹ Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247:1465-1468.
- ⁶⁰ Hyde S.C., Gill D.R., Higgins C.F., Trezise A.E., et al: Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 1993; 362:250-255.
- ⁶¹ Zhu N., Liggitt D., Liu Y., Debs R.: Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 1993; 261:209-211.

- ⁶² Wilson J.M., Grossman M., Wu C.H., Chowdhury N.R., et al: Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J Biol Chem* 1992; 267:963-967.
- ⁶³ Chowdhury N.R. Wu C.H., Wu G.Y., Vernem P.C., et al: Gate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in vivo. Prolonged persistence in cytoplasmic vesicles after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 1993; 268:11263-11271.
- ⁶⁴ Perales J.C., Ferkol T., Beegen H., Ratnoff O.D., Hanson R.W.: Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4086-4091.
- ⁶⁵ Krueger G.G., Moxan J.R., Jorgensen C.M., Schmidt L., et al: Genetically modified skin to treat disease: potential and limitations. *The J of Investigative Dermatol* 1994; 103(5):768-848.
- ⁶⁶ Moxan J.R., Barrandien Y., Green H., Mulligan R.C.: Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* 1987; 237:1476-1479.
- ⁶⁷ Scharfmann R., Axelrod J.H., Verma I.M.: Long term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4626-4630.
- ⁶⁸ St. Louis D., Verma I.M.: An alternative approach to somatic cell gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3150-3154.
- ⁶⁹ Selden R.F., Skoskiewicz M.L., Howie K.B., Russell P.S., Goodman H.M.: Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. *Science* 1987; 236:714-718.
- ⁷⁰ Palmer T.D., Rosman G.J., Osborne W.R.A., Miller A.D.: Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1330-1334.
- ⁷¹ Greenhalgh D., Rothnagel J.A., Koop D.K.: Epidermis: an attractive target tissue for gene therapy. *The J of Investigative Dermatol* 1994; 103(5):638-698.
- ⁷² Hoffman M: Putting new muscle into gene therapy. *Science* 1991; 254:1455-1456.
- ⁷³ Tiberghien P: Use of suicide genes in gene therapy. *J of Leukoc Biol* 1994; 56:203-208.
- ⁷⁴ Wigler M., Silverstein S., Lee L., Pellier A., et al: Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 1977; 11:223-232.
- ⁷⁵ Sullivan SM: Development of ribozymes for gene therapy. *J Invest Dermatol* 1994; 103:878-898.
- ⁷⁶ Zaug A.J., Been M.D., Cech T.R.: The tetrahymena ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease. *Nature* 1986; 324:429-433.
- ⁷⁷ Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marceish T., Pace N., Altman S.: The TNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983; 35:849-857.

-
- ⁷⁶ Forster A.C., Symons R.H.: Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 1987; 49:211-220.
- ⁷⁷ Feldstein P.A., Buzarov J.M., Bruening G.: Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene* 1989; 82:53-61.
- ⁷⁸ Wu H.N., Lin Y.J., Lin F.P., Makino S., et al.: Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an auto-cleavage activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1831-1835.
- ⁷⁹ Barinaga M.: Ribozymes: Killing the messenger. *Science* 1993; 262:1512-1514.
- ⁸⁰ Cohen J.S., Hegan M.E.: The new genetic medicines. *Sci Am* 1994; Dec:50-55.
- ⁸¹ Schuman E.H., Kinnou Y.A., Raffazzi M.C., Desnick R.J., et al.: Neural gene therapy for inherited diseases with mental retardation: principles and prospects. *MRIID Research Reviews* 1995; 1:39-48.
- ⁸² Kay M.A., Woo S.L.C.: Gene therapy for metabolic disorders. *TIG* 1994; 10(7):253-257.
- ⁸³ Scharfman R., Axelsson A.R., Verma I.M.: Long term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4626-4630.
- ⁸⁴ Johnson L.G.: Gene therapy for cystic fibrosis. *Chest* 1995; 107(2):778-836.
- ⁸⁵ Colledge W.H.: Cystic fibrosis gene therapy. *Current Opinion in Genetics and Development* 1994; 4:466-471.
- ⁸⁶ Alton E.W.F.W., Geddes D.M.: Gene therapy for cystic fibrosis: a clinical perspective. *Gene Ther* 1995; 2:88-95.
- ⁸⁷ Welch J.M., Smith A. E.: Cystic fibrosis. *Scientific American* 1995; Dec: 52-59.
- ⁸⁸ Wert S.E., Glasser S.W., Korflagan T.R., Whitsett J.A.: Transcriptional elements form the human SP-C gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. *Dev Biol* 1993; 156:426-443.
- ⁸⁹ Zabner J.: Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with CF. *Cell* 1993; 75: 207-216.
- ⁹⁰ Zhu N., Liggit D., Lui Y., Debs R.: Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 1993; 261:209-211.
- ⁹¹ Dancley M.G., Piper T.A., Dickson G.: Toward a gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *MRIID Research Reviews* 1995; 1:71-78.
- ⁹² England S.B., Nicholson L.V.B., Johnson M.A., Forrest S.M., et al.: Very mild muscular dystrophy associated with deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990; 343:180-182.

- ⁹³ Partridge T.A., Morgan J.E., Coulton G.R., Hoffman E.P., Kunkel L.M.: Conversion of *mdx* myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337:176-179.
- ⁹⁴ Aesadi G., Dickson G., Löve DR., Jani A., et al: Human dystrophin expression in *mdx* mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991; 352:815-818.
- ⁹⁵ Gusconi E., Pavlath G.K., Lanctot A.M., Sharma K.R., et al: Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; 356:435-438.
- ⁹⁶ Kumar Singh R., Chamberlain J.S.: Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum Mol Genetics* 1996; 5(7):913-921.
- ⁹⁷ Nabel E.G.: Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995; 91(2):541-548.
- ⁹⁸ Guzman R.J., Lemayhand P., Crystal R.G., Epstein S.E., et al: Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima. *Circulation* 1993; 88:2838-2848.
- ⁹⁹ Engelhardt J.F., Ye X., Poranz B., Wilson J.M.: Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6196-6200.
- ¹⁰⁰ Morishita K., Gibbons G.H., Kaneda Y., Ogihara T., Dzau V.J.: Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 1993; 91:2580-2585.
- ¹⁰¹ Simons M., Edelman E.R., Dekeyser J.L., Langer R., Rosenberg R.D.: Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature* 1992; 359:67-70.
- ¹⁰² Simons M., Edelman E.R., Rosenberg R.D.: Antisense proliferating cell nuclear antigen oligonucleotides inhibit hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *J Clin Invest* 1994; 93:2351-2356.
- ¹⁰³ Lin H., Parmacek M.S., Morle G., Bolling S., Leiden J.M.: Expression of recombinant genes in myocardium *in vivo* after direct injection of DNA. *Circulation* 1990; 82:2217-2221.
- ¹⁰⁴ Chen S.J., Wilson J.M., Muller D.W.M.: Adenovirus mediated gene transfer of soluble vascular cell adhesion molecule to porcine interposition vein grafts. *Circulation* 1994; 89:1922-1928.
- ¹⁰⁵ Ohno T., Gordon D., Sun H., Pompili V.J., et al: Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994; 265:781-784.
- ¹⁰⁶ Kitis R., Buttrick P.M., McNally E.M., Kaplan M.L., et al: Hormonal modulation of a gene injected into rat heart *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4138-4142.

- 109 Hershfield S. M.: PEG-ADA: An alternative to haploidentical bone marrow transplantation and an adjunct to gene therapy for Adenosine deaminase deficiency. *Human Mutation* 1995; 5:107-112.
- 110 Chaffee S., Mitty A., Stiehm E.R., Girault D., et al.: IgG antibody response to polyethylene glyco-modified adenosine deaminase (PEG-ADA) in patients with adenosine deaminase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 89:1643-1651.
- 111 Fang B., Eisensmith K.C., Wax S.L.C.: Phenylketonuria: a model for hepatic gene therapy. *AIKDD Research Reviews* 1995; 1:56-61.
- 112 Ledley E.D., Grenett H.E., McGinnis-Sheehan M., et al.: Retroviral-mediated gene transfer of human phenylalanine hydroxylase into NIH 3T3 and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:409-413.
- 113 Cristiano R.J., Smith L.C., Wax S.L.C.: Hepatic gene therapy: adenosine enhancement of receptor mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2122-2126.
- 114 Mittal S.K., M. D'Ermo H.M.F., Johnson P.C.: Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter. *Virus Rev* 1993; 28:67-90.
- 115 Robinson M.R., Batshaw M.L., Xuenaia Y., Wilson J.M.: Prospects for gene therapy in ornithine carbonyltransferase deficiency and other urea cycle disorders. *AIKDD Research Reviews* 1995; 1:62-70.
- 116 Batshaw M.L.: Inborn errors of urea synthesis: a review. *Ann Neurol* 1994; 35:133-141.
- 117 Asall M., Batshaw M.L., Suss K., Brusilow S.W., Mollitt E.: Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. *N Engl J Med* 1984; 310:1500-1505.
- 118 Hodges P.E., Rosenbery L.E.: The splash mouse: a missense mutation in the ornithine transcarbamylase gene also causes aberrant mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 90:4142-4146.
- 119 Cavard C., Grumberg G., Dubois S., Chasse J.F., et al.: Correction of mouse ornithine transcarbamylase deficiency by gene transfer into germ line. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:2099-2110.
- 120 Overturf K., Al-Dhalimi M., Tanguay R., Brantly M., et al.: Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type 1. *Nature Genetics* 1996; 12:266-273.
- 121 Kvittingen E.A., Brandzaeg P., Bergan A., Berger R.: Hereditary tyrosinemia type 1. Self-induced correction of the fumarylacetoacetate defect. *J Clin Invest* 1993; 91:1816-1821.
- 122 Kvittingen E.A., Rootwelt H., Berger R., Brandzaeg P.: Self-induced correction of the genetic defect in tyrosinemia type 1. *J Clin Invest* 1994; 94:1657-1661.

151. Cosso W.C., Martinello P., Louis W.J.: Blood-brain barrier disruption using mannitol. Time course and electron microscopy studies. *Am J Physiol* 1989; 256:R443-447.
152. Friedmann T.: Gene therapy for neurological disorders. *Tk* 1994; 12(6):213-214.
153. Friedmann T.: Lesch-Nyhan disease as a model for central nervous system directed gene therapy. *AIKID Research Reviews* 1995; 1:49-55.
154. Johnson E.: Improved cell survival by reducing immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function. *J Viro* 1994; 12:93-102.
155. Culver K.W., Blaese R.M.: Gene therapy for cancer. *Tk* 1994; 10(5):174-178.
156. Schmidt-Wolf G., Schmidt-Wolf G.H.: Human cancer and gene therapy. *Ann Hematol* 1994; 69:273-279.
157. Kasid A., Morecki S., Aebersold P., Cornetta K., et al.: Human gene transfer: characterization of human tumor infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:473-477.
158. Vile R., Russell S.J.: Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1994; 1:88-98.
159. Kim Z., Culver K.W., Wallbridge S., Blaese R.M., Oldfield E.H.: *In situ* retroviral mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1993; 53:83-88.
160. Fluitt G.E., Yang Z.Y., Wu B.Y., Gao X., et al.: Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4645-4649.
161. Nabel G.L.: Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11307-11311.
162. Culver K.W., Kim Z., Wallbridge S., Ishii H., et al.: *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256:1550-1552.
163. Gutierrez A., Lemoine N, Sidora K.: Gene therapy for cancer. *Lancet* 339:715-721.
164. Treian L., Johnson T.R., Rudin S.D., Itri J., et al.: Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor 1 RNA. *Science* 1993; 259:94-97.
165. Scanton K.J., Jiao L., Fujita T., Wang W., et al.: Ribozyme-mediated cleavage of c-fes mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10591-10595.
166. Dropic B., Jeang K.: Gene therapy for Human Immunodeficiency virus infection: genetic antiviral strategies and targets for intervention. *Hum Gene Ther* 1994; 5:927-939.

139. Gilboa E., Smith C.: Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model. *TIG* 1994; 10(5):139-144.
140. Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E.: Analysis of transacting response decay RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation. *J Virol* 1991; 65:6811-6816.
141. Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E.: Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 1990; 63:601-608.
142. Tiley L.S.: Identification of a high-affinity RNA binding site for the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:758-762.
143. Sarver N.: Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990; 247:1222-1225.
144. Bordier B., Helene C., Barr P.J., Litvak S., Sambicotti L.: *In vitro* effect of antisense oligonucleotides on HIV reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:5999-6006.
145. Koshlsh M., Singer R.H.: RNA travel tracks from DNA to cytoplasm. *Cell* 1993; 75:399-401.
146. Sullenger B.A., Cech T.R.: Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 1993; 262:1566-1569.
147. Zuker M.: On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 1989; 244:48-52.
148. Tsuchihashi Z., Khosla M., Herschlag D.: Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. *Science* 1993; 262:99-102.
149. Baltimore D.: Intracellular immunization. *Nature* 1988; 325:395-396.
150. Trono D., Feingold M.B., Baltimore D.: HIV-1 gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell* 1989; 59:113-120.
151. Schwartz S., Effer B.K., Pavlakis G.N.: Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of rev protein. *J Virol* 1992; 66:150-159.
152. Pearson L., Garcia I., Wu F., Medesti N., Nelson J., Gardner R.A.: Transdominant Tat mutant that inhibits Tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long term repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 87:5079-5083.
153. Malim M.H., Reinhart S., Hauber J., Cullen B.K.: Functional dissection of the HIV-1 rev transactivator: derivation of a trans-dominant repressor of rev function. *Cell* 1989; 58:205.
154. Buonocore Y., Rose J.K.: Blockade of human immunodeficiency virus type 1 production in CD4⁺T cells by an intracellular CD4 expressed under control of the viral long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2695-2699.

-
155. Bridges S.H., Sarver N: Gene therapy and immune restoration for HIV disease. *The Lancet* 1995; 345:427-432.
156. Wang B., Urjen K.E., Srikantan V.: Gene inactivation generates immune response against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4156-4160.
157. Gutiérrez A.A., Gómez-Concha C., Mas-Oliva J.: Novel approaches for gene-based therapies in prostatic cancer. *Frontiers en Biotecnología y Bioingeniería*. Edit. E.Galindo, Mexico 1996, pp 419-425.
158. Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum Gene Ther* 1994; 5:1537-1551.
159. Fletcher J.C: Gene therapy in mental retardation: ethical considerations. *MRIID Research Reviews* 1995; 1:7-13.
160. Walters L: The ethics of human gene therapy. *Nature* 1986; 320(20):225-227.
161. Anderson W.F: Human gene therapy. *Science* 1992; 256:808-813.