

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

8
Jes.

“TERAPIA GENICA”

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
RAFAEL URIBE ESPEJEL

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. JOSE ANTONIO GARCIA MACIAS

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263290



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.

AGRADECIMIENTOS:

Por el esfuerzo realizado durante los años de estudio, agradezco eternamente el apoyo y comprensión a MIS PADRES, ya que sin la paciencia y fé que tuvieron en mí, no se lograría cumplir el deseo de concluir los estudios iniciados.

A mis hermanas Blanca y Maricarmen, por tener en ellas una fuente de ayuda permanente de donde se derivan siempre cariño y cordialidad, además de mis sobrinos Enrique y Víctor que representan una nueva bendición a la familia.

A mis tías y tíos, Mago, Reyna, Rosa, Luchíz, Marcos, Luis y Tomás, gracias por tener en mí el cariño necesario que una persona puede recibir desde el primer día de vida. A mis primas y primos, Rocío, Alma, Diose, Mauri, Diego, Ricardo, Marcos, Ale, Beto, Carlos, Vale, que sin su apoyo y comprensión incondicional aportan más de lo que uno puede esperar; por todo gracias.

Especialmente agradezco el apoyo y cooperación al Director de la presente tesis, Q. F. B. José Antonio García, que con su paciencia, inteligencia y amabilidad representa la filosofía que rige a la misma Universidad.

A todos los profesores el cual tuve la fortuna de conocer profesional y personalmente, especialmente al maestro Enrique Calderón por toda su entrega que realiza día a día. A Jorge García, el cual tuve la fortuna de recibir sus enseñanzas dentro y fuera de la escuela.

A Gina, Ángeles, Alejandro Abara y Vielma, Juan José, Adriana, Chuy, Erika Rodríguez y Bayardo, Marisol, Ana Mercado y Cerón, Verónica Cadena, López y Vega, Lilí, Fer, Chocho, Lalo, Sandino, Elisa, Lety, Mónica, Bety, Tere, Rosa, Mara, Tony, Ma. Luisa, Rosina, Pilar, Karelia, Margarita, Raquel, Cecilia, Lorena, Silvia, Yessica y Carolina, que con ellos compartimos angustias, deseos,

tristezas, alegrías e ilusiones; gracias por haber disfrutado una parte de su vida con la mía.

Quiero agradecer cordialmente a las familias Abara Vázquez que en momentos de trabajo y diversión me recibieron gustosamente en su hogar. También muy especialmente a la familia Sandoval Caracas por haberme tenido la confianza y el cariño demostrado hasta el momento; gracias.

Muy especialmente agradezco el apoyo y comprensión de mis amigos y vecinos Rodrigo, Armando, Gerardo, Fernando, Martha, Ernesto y Adrián.

A kiri.

A la escuela.

INDICE

INDICE

1. Objetivos:	7
2. Capítulo Primero:	
Introducción	9
3. Capítulo Segundo:	
3.1 Generalidades	19
3.1.1 Vectores de expresión	19
3.1.2 Cáncer	21
3.1.3 La terapia génica y la industria farmacéutica	23
3.1.4 La terapia génica en el Sistema Nervioso Central	31
3.1.5 La terapia génica para el S.I.D.A.	34
3.1.6 Deficiencias y otras enfermedades	39
4. Capítulo Tercero:	
4.1 Terapia génica en el tratamiento del cáncer	57
5. Capítulo Cuarto:	
5.1 Terapia génica para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida	71
6. Capítulo Quinto:	
6.1 Terapia génica para el tratamiento de diversas deficiencias	81
7. Capítulo Sexto:	
7.1 Conclusiones y perspectivas	91
8. Glosario	96
9. Bibliografía	98

1. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1. Analizar los avances en terapia génica de 1992 a 1995 en las áreas de cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sistema nervioso central inmunodeficiencias y otras enfermedades.
2. Realizar una comparación objetiva de los vectores utilizados.
3. Proponer perspectivas en cuanto al desarrollo de la terapia génica particularmente en México.

2. CAPITULO PRIMERO

2. INTRODUCCION

Grandes avances han ocurrido en biología molecular en los últimos veinticinco años. El descubrimiento de la ligasa del ácido desoxirribonucleico, la transcriptasa inversa, y las endonucleasas de restricción han contribuido a la construcción de moléculas recombinantes de ADN. Esta serie de descubrimientos, junto con los mayores avances en la técnicas de biología molecular, se unen para abrillantar la explosión en el progreso científico que hasta el momento se ha tenido. Estos avances tienen incluidos un profundo aumento de nuestro entendimiento en la estructura de genes, su función y control en este campo de la biología molecular. El mapeo y secuencia de genomas de varias especies incluyendo el humano están siendo estudiados con detenimiento. Un conocimiento de las bases exactas de la genética de padecimientos es también de gran valor en el desarrollo de clonas y de los genes que causan diversos padecimientos. La habilidad para generar animales transgénicos ha sido una invaluable herramienta para la comprensión de la biología. La aplicación de esta tecnología ha sido también dirigida al desarrollo de modelos animales para diferentes padecimientos.

La terapia génica humana puede ser definida como la inserción de un gen normal o modificado dentro de células somáticas de pacientes para la corrección genética o de desórdenes adquiridos por error, a través de la síntesis *in vivo* por genes defectuosos o insuficientes. Algunos científicos, con su campo de aplicación en el ambiente clínico, han pensado en la terapia génica por décadas, pero en la actualidad el conocimiento y la tecnología son ahora lo suficientemente maduros, para que en un futuro muy próximo, serias consideraciones puedan ser

tomadas para la aplicación práctica de la terapia génica en humanos. De hecho, con la iniciación del primer experimento humano, en terapia génica realizado en septiembre 14 de 1990, ésta nueva era ha empezado.

Durante los cinco años anteriores, el progreso en el campo de la biología molecular ha sido muy acelerado. Cada nuevo descubrimiento promete un nuevo acercamiento que no había sido considerado anteriormente. Los estudios actuales serán muy conocidos para los terapistas genéticos en la mitad del siguiente siglo.

El estudio del genoma humano en los próximos años será un trabajo rutinario. Como el genoma humano se estudia por el mapeo, la habilidad para definir los genes responsables de padecimientos genéticos crecerá rápidamente. Es completamente aparente que el descubrimiento de cada gen en un padecimiento humano, proporciona un conocimiento para la terapia génica. Ciertamente, descubrimientos de cualquier gen humano proporciona la función y los planos correctos de una función defectiva. Se trata del repertorio expandido de las principales deficiencias del padecimiento en cuestión.

No hace mucho que las oportunidades para la terapia génica son definidas por el conocimiento de genes para enfermedades específicas, asimismo son hechos posibles por un entendimiento mejor de la patofisiología. De este modo la formación de productos puede ser inhibida por transcripción. Ciertamente, el desarrollo de la terapia génica para enfermedades neoplásicas ilustran otro fenómeno general. En algunos de esos estudios, el gen es utilizado para codificar un producto que genera una respuesta inmune no únicamente para los productos de proteínas sino para la célula en la cual, la proteína es puesta en libertad. De

aquí, que un gran número de oportunidades para la terapia génica contienen hoy un plano más amplio que aquellos en los que se encuentran los genes.

Naturalmente desde hace mucho se han desarrollado métodos para la introducción estable de ADN extraño en el interior de células animales, en la forma de virus. El acierto de reproducir estos procesos con genes se usó antes que la moderna tecnología permitiera la manipulación y clonación de genes *in vitro*. Cuando la estructura y ciclo de vida de los virus se realizó *in vitro* y ADN en clonación, la terapia génica se presenta como un acierto.

Como el trabajo procedía, un número de dificultades estaban dentro del foco principal. Consideraciones de Seguridad -en particular, las que necesitan evaluación que deriven desde un ligero riesgo potencial en el uso de virus como vectores de reactivación oncogénica- son en el presente un punto de evaluación legal. Problemas con la obtención de una alta concentración de vectores virales incluían vectores marcadores que podrían infectar un rango más favorable de células humanas. La identificación y la extracción *in vitro* de células del tronco principal y establecimiento de un estado receptivo para vectores son algunos de los problemas del presente tema. Un gran número de grupos de investigadores que dominan la técnica de terapia génica, han obtenido datos que indican que células primitivas murinas son precursoras de células las cuales pueden ser mantenidas *in vivo* y hacer más grande la población de la colonia por la presencia de combinaciones acercadas de citosinas y que pueden ser transducidas eficientemente con vectores retrovirales.

En adición a los problemas relacionados a la efectividad y seguridad de genes liberados, un nuevo asentamiento de problemas emergen cuando la

expresión de ADN integrado de varios promotores fue estudiado en animales transgénicos o en modelos experimentales de la terapia génica usando vectores retrovirales en animales. En algunos experimentos estas diferencias en cierto modo pueden ser debido a los requerimientos para la expresión continua de un gen de cadena marcado en los experimentos llevados *in vivo* y los posibles efectos de la secuencia selectiva marcadora en la expresión de genes adyacentes *in vivo*.

Grandes técnicas existen para la introducción de genes no propios dentro de células humanas, incluyendo el uso de fosfato de calcio, policondrosulfato, vesículas lipídicas, corriente eléctrica, o microinyección directa. La eficiencia de un transferidor de genes dentro de las células usando estas técnicas es generalmente tan bajo como un 0.01%. Debido a la necesidad de un medio de transferir de alta eficiencia de ADN dentro de las células para aplicaciones clínicas, la atención ha sido crecientemente cambiada para el uso de los virus, especialmente los virus transformadores de ADN como los papovavirus, adenovirus, o más recientemente los retrovirus avícolas como sistemas de liberación. Estos vectores virales tienen la ventaja de infectar tipos de células múltiples con una eficiencia casi de un 100%.

Usando líneas de células de empaque, retrovirus con su proteína viral codifican secuencias borradas que pueden ser generadas. Estos retrovirus modificados por medio de la ingeniería genética pueden infectar células e insertar genes exógenos, pero ellos no se pueden replicar y producir infecciones virales adicionales. Por esta razón, los retrovirus, especialmente aquellos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney, son por ahora usados con aplicaciones clínicas.

Las primeras aplicaciones de la forma de transferir a los genes dentro de humanos es usando el medio adoptivo de linfocitos. El linfocito infiltrador de tumores (TIL) frecuentemente tiene reactividad específica contra el tumor de origen, y extensivos estudios en animales demuestran que el introductor adoptivo de TIL con IL-2 puede mediar la regresión de cánceres avanzados en selectos modelos animales. Estos estudios indican hacia un uso clínico de TIL para la terapia del cáncer en humanos. Sobre un 40% de pacientes con melanoma maligno metastásico sufren regresiones objetivas de cáncer cuando son tratados con el introductor adoptivo de TIL con IL-2.

En estudios extensivos en humanos TIL tanto *in vivo* como *in vitro* ha guiado el desarrollo de las futuras aplicaciones clínicas. Siguiendo la transferencia *in vivo*, células TIL marcadas con indio 111 migran y se acumulan en depósitos tumorales. De cualquier modo, el corto tiempo de vida media del indio 111 (2.8 días) combinado con esta rápida y espontánea pérdida de células previenen medidas de sobrevivencia de TIL más allá de los días severos. La introducción de genes extraños marcadores que pueden asentar una parte permanente del genoma pueden replicarse como TIL proveyendo oportunidades para el estudio de la distribución y prolongamiento del tiempo de vida de TIL *in vivo*.

La habilidad de TIL para acumularse en los sitios tumorales fue un importante factor en el desarrollo de los primeros estudios en humanos de la transferencia de genes.

El predominante acercamiento a la terapia génica generalmente involucra el uso de ácido ribonucleico recombinante (retrovirus) o virus con ADN como vectores. El reconocimiento de que los virus pueden ser manipulados en

semejante vía la cual no puede ser replicada para la forma competente del virus y con todo para insertar un gen de interés dentro del genoma hospedero, ha proveído una mayor dirección para el campo de la terapia génica en los primeros años, para desarrollar un gran alcance, y por arriba del presente tiempo. Debido a una mayor edición tal como la seguridad, buscando el blanco, expresión, e incapacidad para insertar genes dentro de células nonreplicativas, el concepto que involucra a las células pueden ser removidas del hospedero, infectado (o transducido) con el apropiado retrovirus *ex vivo*, y estas células modificadas genéticamente pueden ser regresadas hacia el hospedero para la expresión del nuevo e integrado gen. Este acercamiento *ex vivo* ha sido aplicado en establecimiento experimental para un largo número de células diferentes en cultivo. Ciertamente, podría parecer que el único factor limitante de este acercamiento es la habilidad para cultivar células en cultivos continuos con un mínimo de una división celular.

La infección *in vivo* del hospedero con ADN recombinante modificado ha conducido a que genes humanos de interés sean acarreados fuera de células neuronales utilizando las propiedades tróficas de un virus del *Herpes simplex*, tipo I, con el fin de buscar el sistema nervioso central. La infección directa del hospedero con un virus recombinante contiene el gen de interés teniendo las diferentes ventajas sobre el gen de inserción *ex vivo*. Un virus puede ser seleccionado basándose en las propiedades tróficas como las que se le darán en el órgano blanco o en los órganos de interés. Con el uso de virus de ADN, frecuentemente ocurre persistencia extra cromosómica, e integración no necesaria dentro del genoma del hospedero. De este modo, no es requerimiento para la división celular, asimismo, no representa un problema serio las series de dificultades de potenciales asociadas con la inserción aleatoria dentro del

genoma, semejante a una mutagénesis insercional. De hecho, la posibilidad de incluir funciones adicionales en ese paquete de minigenes, tal como secuencias autónomas replicativas o replications de origen, puede ser posible para la construcción de elementos episomales dada la función como microcromosomas en el núcleo de la célula. La latencia de algunos virus es una característica durante algún tiempo, a menudo para el tiempo de vida del hospedero, productos de selección de genes virales son expresados pero el virus no es nocivo. En contraste para la eliminación de 9 a 10 kb para retrovirus, virus de ADN pueden frecuentemente acomodar muchos segmentos de ADN, y, de aquí, transferir unos largos genes y/o las secuencias regulatorias pueden bajar las dificultades. Finalmente, el acercamiento *in vivo* demuestra cuan bajo es la intensidad de la tecnología en comparación con el acercamiento *ex vivo*.

Los virus de ADN tienen la ventaja sobre los retrovirus que la infección ocurre con muy alta eficiencia. La posibilidad de modificar los virus de ADN que son incompetentes para la replicación, por lo cual son incapaces para infectar células, no lisando las células del hospedero y ni tampoco para infectar otras células representa una propiedad adicional en el uso de virus de ADN como vectores. No hace mucho tiempo el campo de la vectorología de ADN no ha sido modificada como lo es en el caso de vectores retrovirales; teóricamente el mismo tipo de avances en la construcción de vectores serán posibles.

No hace mucho tiempo estudios preliminares que se reportaron, en los cuales un transferidor de genes directo *in vivo* es acarreado hacia afuera usando virus de ADN, subsecuentemente otros acercamientos con inserción directa de ADN han sido desarrollados, usando vectores sintéticos (noviral), liposomas, inyección directa de plásmidos de ADN, y un plano de bombardeo de partículas.

Acercamientos *in vivo* han sido ahora aplicados hacia un mínimo de seis blancos celulares y sistemas de órganos, como son el antígeno de leucocitos humanos B-7 (HLA-B7) para los melanomas malignos, el gen del virus de timidina cinasa del *Herpes simplex* (HSV-TK) para los glioblastomas y los astrocitomas, el factor regulador transmembranal de fibrosis cística (CFTR) para la fibrosis cística, el gen *env + rev* del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1_{env + rev}) para el SIDA, y el HLA-B7 + β -2 microglobulina para el cáncer.

El pleno desarrollo de la terapia génica puede ser llevado fuera del interés público. Esto fue llevado a la comisión respectiva y generado a lo largo de los años 80's, serán continuados. Se debe comprender el riesgo-beneficio y el costo beneficio del desarrollo de la terapia génica y este potencial en la larga carrera para el tratamiento, prevención, y cura de padecimientos humanos. Ciertamente, el faltante de una educación suficiente podría tener efectos perjudiciales en un número de vías por desarrollar en esta teoría. Primero, la oportunidad para interpretar mal la terapia génica como eugenésica es obvia. Con la educación debida, puede ser minimizada y quizá evitada del todo. Segundo, el potencial que el público puede demandar en el progreso en el campo que puede ser excesivo para la capacidad de científicos y clínicos para recopilar. Realmente, se debe de tomar en cuenta la aportación de ciertos grupos en contra del desarrollo y tratamiento de la terapia génica, como en el caso de la corriente anti-terapia en favor del SIDA. Pareciera completamente que el curso mismo del desarrollo puede ocurrir en el campo de la terapia génica como un campo continuo para desarrollar si el proceso de educación es bien orientado hacia un mejor entendimiento de los diversos males y la manera de contrarrestarlos.

Se puede mencionar que el impacto de la terapia génica en el siglo 21 será *el mismo de ahora, o quizás en un plano más grandioso*, que el impacto que tuvieron los antibióticos y las inmunizaciones en el siglo 20, de ahora en adelante saldrán innumerables obstáculos y comienzos falsos. Un gran ideal necesita ser realizado, y la oportunidad es grandiosa.

3. CAPITULO SEGUNDO

3.1 GENERALIDADES

3.1.1 VECTORES DE EXPRESION

Los retrovirus han sido los vectores más comúnmente utilizados en estudios de terapia génica y desde hace mucho tiempo se conoce su función y estructura. Asimismo, los adenovirus se presentan como una alternativa más de vectores genéticos, que pueden ser producidos en concentración suficiente para una eficiente transfección de genes *in vivo*. Los adenovirus representan uno de los 3 nuevos sistemas de genes de transfección presentados en la conferencia sobre terapia génica para Enfermedades Neoplásicas en la Academia de Ciencias de Nueva York en el mes mayo de 1993.

En el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre en los EE.UU., se ha estudiado el uso de 3 vectores de adenovirus para la transfección de un gen: marcado con β -galactosidasa: los genes terapéuticos α 1-antitripsina o el factor regulador transmembranal de fibrosis cística (CFTR). Tanto *in vitro* como *in vivo*, los datos experimentales mostraron que diversos tejidos son altamente receptivos para la transfección de estos genes usando un adenovirus como vector.

La construcción de vehículos altamente eficientes en la transfección de genes, los cuales contienen genes extraños, se ha logrado gracias a que actúan como moléculas biológicas. El haber utilizado transferrina como un modelo de ligando, ha mostrado que los genes extraños pueden internalizarse y expresarse en células que expresan receptores de transferrina. La ubicación de células tumorales con lecitinas como ligandos es otra posibilidad ya que éstas pueden unirse a las glicoproteínas de superficie de células tumorales.

En la Universidad de Pittsburgh Pennsylvania, se ha descrito el uso de liposomas como otro vehículo para la transfección de genes. Uno de los mayores problemas de la transfección mediada por liposomas es la toxicidad causada por los componentes lipídicos del complejo ADN-liposoma. La toxicidad puede ser reducida por el cambio del contenido lipídico, pero se puede caer en una mayor inestabilidad. Los liposomas de DC-Chol dan el mejor equilibrio entre toxicidad y estabilidad, y se han usado para tratamientos clínicos de melanomas.

La introducción de genes suicidas y la inducción de sensibilidad a drogas en células tumorales, ha sido estudiada tanto por el Laboratorio de Investigación Wellcome en Carolina del Norte, EE.UU., como en la Real Escuela de Postgraduados de Medicina, en Londres Inglaterra, presentando sus estudios de terapia génica, basados en la estrategia conocida como VDEPT (Terapia Productora de Enzimas Dirigida por Virus), la cual utiliza un vector retroviral para liberar un gen extraño que codifica a una enzima, la cual convierte un producto inocuo en un compuesto citotóxico. Citosina desaminasa, por ejemplo, convierte la relativamente inofensiva 5-fluorocitosina en el compuesto citotóxico 5-fluoracilo.

En el Instituto Nacional para el Cáncer, de los Institutos Nacionales de Salud, en EE.UU., se ha discutido el "efecto circunstante", se discierne en experimentos que involucra productos de activación de enzimas semejante a la timidina cinasa del virus de *Herpes simplex* (HSV-tk), cuya función es fosforilar el ganciclovir para metabolitos tóxicos. En una mezcla de células tumorales en las cuales únicamente la expresión media de HSV-tk, sobre 90% de las células en la mezcla mueren con la exposición hacia el profármaco. Se cree que este efecto puede ser causado por la transfección de metabolitos tóxicos a través de la

abertura de las uniones de células tumorales. Este efecto puede ser usado para evadir la posibilidad de encontrar cada célula tumoral *in vivo*.

3.1.2 CANCER

La inmunomodulación de células tumorales para inducir una respuesta inmune se ha discutido en años recientes. Efectos inmunes celulares y humorales, semejante al de células T citotóxicas que inhiben el crecimiento de células cancerígenas han sido reproducidos. Las células T citotóxicas reconocen al antígeno tumoral asociado a moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC I) en la superficie de células tumorales e inducen una respuesta inmune celular. La deficiente expresión de moléculas clase I del MHC en algunas células tumorales, contribuye a la evasión completa del sistema inmune. Se han presentado datos tanto *in vivo* como *in vitro* en la Universidad de Michigan, EE.UU., los cuales indican que la transfección de genes de una molécula alogénica clase I del MHC dentro de células de melanoma, induce la expresión del antígeno extraño en su superficie y por tanto, inducen una respuesta citotóxica de células T; como resultado hay una regresión parcial tumoral (como una consecuencia del acrecentamiento inmunogénico tumoral). La expresión del gen extraño en células tumorales resulta en una respuesta específica citotóxica de células T en contra de antígenos previamente irreconocibles. Recientemente iniciado el tratamiento clínico basado en estos hallazgos, las moléculas MHC I fueron las primeras de dichos genes en ser introducidos directamente dentro de liposomas DC-Chol a células tumorales.

El uso de linfocitos infiltradores de tumores (TILs) manufacturados por medio de la ingeniería genética hacia la inmunoterapia adoptiva de melanomas,

fue propuesta en el Instituto Nacional para el Cáncer, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). En estos estudios, más de 9 pacientes han sido tratados con TILs que expresan el Factor Necrosante de Tumores (TNF); los resultados de la Fase I muestran datos controversiales en cuanto a la relación dosis-toxicidad (4).

La inmunoterapia, promete alcanzar la prevención del efecto de metástasis ocasionado por una fase avanzada de cáncer de mama, acorde a los nuevos estudios animales. El tratamiento abre la posibilidad de nuevas oportunidades al aumentar un período de supervivencia después de la extirpación de tumores mamarios primarios, asegurado por el Programa Molecular Terapéutico del Centro de Medicina de la Universidad de Duke, EE.UU.. Los investigadores quirúrgicos implantan células tumorales de cáncer mamario sobre el pie de un ratón. Estas células se desarrollan con 7 días de implantación. Después de 20 días, los investigadores remueven los tumores. El ratón desarrolla después metástasis pulmonar en una manera similar del curso clínico de una paciente con metástasis de cáncer mamario. Debido a que el tratamiento con interleucina-2 (IL-2) ha sido eficaz en modelos animales para estimular y generar la activación de linfocinas de células asesinas (NK), con el resultado de la eliminación de la carga tumoral, los investigadores inyectaron a los ratones con células de cáncer mamario genéticamente alteradas para secretar IL-2. La IL-2 es manipulada genéticamente dentro de células tumorales, para favorecer la secreción de ésta por las células tumorales, hacia el tejido circundante. Los niveles de citosina que son altamente suficientes para estimular el sistema inmune, son logrados sin ninguno de los efectos tóxicos generalmente asociados con IL-2 sistémica, semejante al edema pulmonar, fallo renal y estado de shock (5).

Un número considerable de las producciones de cáncer son asociados con cualquiera de las mutaciones de la región transmembranal del *neo* gen, o con niveles muy altos de expresión del mismo gen, o con la interacción sinérgica de los receptores p185 y los receptores del factor de crecimiento epidermal. Tales eventos pueden guiar hacia la transformación de dímeros, con la activación de la región enzimática de los receptores de p185 como si ello comenzara continuamente a estimular para un factor de crecimiento.

Los investigadores desarrollaron anticuerpos que unen 2 o más dominios no traslapados de la *porción extrema del receptor p185*, entonces son usados estos anticuerpos para tratar profilácticamente ratones transgénicos que son genéticamente modificados para desarrollar tumores de mama de 40 semanas de edad.

En un ratón tratado de 2 semanas con 10 microgramos de los anticuerpos comenzados con 6 semanas de edad, la aparición del tumor estuvo retrasado en el promedio por más de 10 semanas. Cuando la dosificación estuvo incrementada por 20 microgramos semanales, el desarrollo de tumores fue completamente prevenido en sobre un tercio de los animales (27).

3.1.3 LA TERAPIA GENICA Y LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

En el mes de febrero de 1994, una nueva y establecida terapia génica, protegida por el comité de la Universidad de Niigata, de la costa japonesa, fue aprobada en Japón. Aquí se inicia el primero de varios experimentos para ser llevados en humanos, lo cual puede marcar a Japón como el país en dar el

primer paso hacia la terapia génica en humanos. Los experimentos propuestos son desarrollados por la división de transplatación de huesos y médulas de la Universidad de Niigata, en colaboración con la Genetic Therapy Inc., una compañía estadounidense.

Células humanas del tronco (células CD34(+)) y células residuales de leucemia en médula de huesos tomadas de pacientes con leucemia en remisión, serán marcadas con el gen bacteriano para la resistencia de neomicina (neo-R). Después de la transplatación se regresan estas células al paciente y las células marcadas serán usadas para determinar si alguna reaparición de cáncer es causada por células residuales malignas en la médula purificada, o por células del paciente. La compañía Genetic Therapy Inc. proveerá los vectores retrovirales para la marcación de genes.

En una larga discusión, después de 8 meses de deliberaciones el comité dio la aprobación para los experimentos en el mes de febrero de 1994 en condiciones que la aplicación es hecha para cada paciente y por medio de su consentimiento, se obtiene la información deseada. La universidad, de cualquier modo, está bajo la jurisdicción del Ministro de Educación, Ciencia y Cultura de Japón, con lo cual no se ha establecido el lineamiento para la investigación de la terapia génica.

Además, como los experimentos involucran pruebas clínicas en humanos, oficiales del Ministro de Salud y Bienestar de Japón creen que la aprobación debe también ser solicitada por un comité en su ministerio.

No está claro cual comité es el que llevará la última autoridad para rechazar o aceptar las aplicaciones de los investigadores de la universidad. Pero, acordando que un científico está involucrado en los principios de los lineamientos del gobierno, el Ministro de Salud y Bienestar difícilmente rechazará protocolos que previamente el ministerio de educación ha aprobado. Investigadores involucrados en la terapia génica critican tales duplicaciones de esfuerzos como "insentido burocrático". (8)

El Gobierno de Japón al ver la naturaleza de los problemas de jurisdicción, decidieron crear un organismo independiente para respaldar las investigaciones en terapia génica. Sin embargo, la inauguración de un nuevo organismo para tales fines creó una incertidumbre en el diseño del mismo. Por lo tanto, decidieron organizar un comité con las mismas estructuras y proyectos que los de ya iniciados en el campo de la terapia génica; decidieron adoptar el sistema del Comité Consultivo de ADN Recombinante de los EE.UU., soportando todas las expectativas de desarrollo e investigación acerca del tema. En donde el Gobierno estadounidense se opone a tal disposición de su Comité al permitir el cuestionamiento sobre algunas decisiones que se llegaron a tener con la prensa y el público en general. (9)

En el inminente umbral del progreso de la terapia génica en la nación nipona, el gobierno japonés ha pedido a los EE.UU. su ayuda en la exportación de los vectores a utilizar. Con la ayuda proporcionada por el gobierno estadounidense al gobierno japonés, se montan las bases para la implantación de la terapia génica en la nación de oriente, lo cual implica la participación de la industria farmacéutica japonesa al invertir en el desarrollo de vectores necesarios para el tratamiento de algunos desórdenes genéticos.

Los objetivos del establecimiento de la terapia génica en oriente están dirigidos principalmente en la lucha de padecimientos como son el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), hepatitis viral, cáncer, la deficiencia de adenosina desaminasa y en otras enfermedades. Otro problema que surge con la realización de la terapia génica es el número de animales en los cuales son probados los vectorés; en este caso se usan los chimpancés, los cuales constituyen un número muy reducido de vías para garantizar que los vectores son adecuadamente seguros para fines eugenésicos (11).

La terapia génica en Francia ha tomado un gran paso desde el laboratorio hacia las camas de hospital, con la decisión hecha por Rhône-Poulenc-Rorer (RPR), la subsidiaria farmacéutica del grupo Rhône-Poulenc, para concentrar estos negocios de biotecnología en terapia génica en contra del cáncer. Para lograrlo, RPR ha creado una nueva división conocida como Biotech. Esta organización de actividad biotecnológica del grupo RPR, incluye un número de 250 personas que integran el equipo del centro biotecnológico en Vitry en el sur de París, y el 37% del personal contingente pertenece a una compañía estadounidense de terapia génica llamada Ciencias Inmunes Aplicadas. Una de las razones por el ferviente interés del grupo sobre la terapia génica es que RPR ha perdido el liderazgo en el desarrollo de fármacos recombinantes, tomando la compañía una postura de espectador al ver como los competidores capturan todos los posibles candidatos de desarrollo como la hormona de crecimiento. En pocas palabras, es un gran suceso en el historial de la industria farmacéutica escrita por otras compañías.

Por esto, el grupo RPR ha lanzado en el menor tiempo, el mayor programa de química correspondiente a los finales de siglo invirtiendo en el programa

1,600,000,000 FF lanzado conjuntamente con el gobierno a inicios de la última década del siglo (12). La compañía farmacéutica franco-estadounidense Rhône-Poulenc Rorer, ha anunciado un ambicioso plan para crear una nueva forma de organización industrial para la comercialización de la terapia génica a través de una red de trabajo de grupos de investigadores y compañías de biotecnología.

El plan de la compañía para el uso de esta red, es reunir las diferentes tecnologías necesarias para tal terapia. Analistas de biotecnología dan una entusiasta bienvenida al movimiento, con lo que el acercamiento a la red puede ser más apropiado para la terapia génica que cualquiera de los tradicionales acercamientos hacia la investigación de fármacos en grandes compañías. (13)

El anunciamiento de la compañía Rhône-Poulenc Rorer del plan de organización industrial es seguido por iniciativas similares por otras grandes compañías farmacéuticas -como son SmithKline Beecham, Glaxo, Roche y Eli Lilly- para unir esfuerzos con académicos y compañías realizadoras de biotecnología en investigación referente a genes.

Varios grupos alrededor del mundo realizan pruebas de terapia génica para la fibrosis cística, pero RPR es la primera compañía en lanzar un ataque agresivo en los más comunes padecimientos -entre sus objetivos están el cáncer, aterosclerosis, y desórdenes del sistema nervioso central tales como el mal de Alzheimer-.

La compañía RPR ha arriesgado una gran cantidad de dinero sobre su postura: a finales de 1995 la compañía había gastado 300 millones USD dentro del montaje de la red, la cual será enfocada a una nueva división de la compañía,

RPR Gencell, con el centro general en Collegeville Pennsylvania EE.UU. y un equipo de apoyo de 150 integrantes. (14)

El Servicio Público de Transfusión de Sangre en Inglaterra podría eventualmente desenvolverse dentro de un servicio de "reemplazo de genes" bajo propuestas entabladas por un grupo de científicos médicos en el mes de febrero de 1993. El grupo sugiere que, como la terapia génica viene más extensivamente a practicarse, los servicios y experiencia de colecta de sangre de donadores y liberaciones para los hospitales puede ser adaptado para la tarea de coleccionar células y organizarlas genéticamente antes de la transplatación dentro de pacientes.

El Servicio Escocés Nacional de Transfusión de Sangre ya está tomando un pequeño paso en esta dirección. Investigadores de Edimburgo trabajarán con la universidad local y grupos de hospitales para preparar tales experimentos.

La idea de implicar los servicios de transfusión viene dada por una tarea forzada en terapia génica y su implantación, establecida por el Comité Consultivo en Ciencia y Tecnología como parte de un amplio estudio de investigación médica y de salud dirigido por la Universidad de Cambridge, con lo cual se logra dislumbrar las vías de investigación de las cadenas genéticas para aplicaciones sociales. Una ventaja de la involucración de los servicios de transfusión en terapia génica es su buena reputación (17).

El Comité Investigador Médico (MRC) en Inglaterra ha aceptado una significativa inversión en una nueva compañía, creada para explotar la investigación fundada por el comité tecnológico en terapia génica. La compañía

conocida como Therexsys, espera para desarrollar una técnica de terapia génica que ubique genes terapéuticamente efectivos en células humanas sin usar más los convencionales vectores como retrovirus y adenovirus.

Therexsys espera para desarrollar un acercamiento en la terapia génica en la cual los genes son ubicados y regulados con exactitud. La tecnología podría ser aplicable para ambos casos y, eventualmente, a terapias crónicas en un número amplio de enfermedades, incluyendo cáncer, padecimientos cardiovasculares y el tratamiento de inflamaciones (18).

Las autoridades federales y estatales en Alemania y una compañía menor farmacéutica han empezado a verter substanciales cantidades de dinero dentro de la investigación en el uso terapéutico de los genes. Una minoría de 8 grupos son ahora comprometidos en la investigación de la terapia génica.

El resultado de tal actividad, concierne a un subsidio, en tanto que científicos y compañías alemanas podrían quedar rezagados en este campo por competidores europeos de cualquier parte de Europa. A inicios del mes de septiembre el ministro federal de investigación y tecnología (BMFT) anuncia que se está preparando para consumir alrededor de 60 millones DM (37 millones USD) sobre los próximos 6 años para respaldar pruebas en técnicas de terapia génica.

El acierto del programa de terapia génica consiste en desarrollar pruebas y técnicas para la transferencia de genes dentro el cuerpo humano, en vías de las cuales se podrá permitir el tratamiento de enfermedades como el cáncer y el SIDA.

La investigación en terapia génica ya ha comenzado, respaldada por los mismos alemanes de la fundación Deutsches Forschungsgemeinschaft (DFG) para la investigación universitaria. En particular, la DFG ha proveído 6.6 millones DM para soportar en 3 años un programa de investigación en la Universidad de Friburgo dentro de las bases moleculares y celulares de mecanismos de defensa del hospedero contra tumores.

Se ha descrito ya un proyecto en el cual se inyecta a un animal una vacuna, que contiene un cultivo de células tumorales inactivas y fibroblastos transgénicos, dentro de los cuales han sido insertados genes para la producción de IL-2. Los primeros esfuerzos, de cualquier modo, han sido decepcionantes. El sistema trabaja bien en ratones, activando células T citotóxicas llevando a cabo la selección y la desactivación de células cancerígenas. Pero experimentos avanzados con células humanas han sido infructuosos.

La compañía farmacéutica alemana Boehringer Ingelheim anunció un plan junto con la Universidad de Friburgo para el tratamiento de carcinoma renal, usando un receptor por medio de la endocitosis, la cual es una patente de la compañía.

Algunos grupos en Heidelberg -como son la Policlínica Médica y el Centro Alemán para la Investigación en Cáncer-, están planeando comenzar pruebas de terapia génica para los tratamientos de melanomas. Otros grupos planean experimentos en el uso potencial de la terapia génica para el tratamiento de la leucemia y hemofilia, y también disturbios metabólicos como la hipercolesterolemia. Boehringer Ingelheim es la única compañía que tiene

públicamente el reconocimiento de sus intereses en la investigación de la terapia génica, ya que la oposición pública repudia el uso de los virus como vectores (20).

3.1.4 LA TERAPIA GENICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Científicos de laboratorio y de clínicas del mismo modo han anhelado la habilidad para alterar genéticamente células del cerebro. Si fuera posible esta manipulación, el cáncer cerebral podría ser erradicado. Pero la multitud de otros padecimientos adquiridos y heredados que involucran al sistema nervioso central han puesto en discusión estos temas.

Desde un punto de partida de la ciencia básica, los investigadores podrían abrir las puertas a los misterios del desarrollo neuronal y otros enigmas por el estudio de la función y la regulación de genes clonados en modelos animales. Por muchos años, sin embargo, el cerebro ha probado ser intratable para la ciencia embrionaria de la transfección de genes. Ya que las células cerebrales no proliferan, los primeros protocolos requerían de la replicación de ADN para la liberación del material genético, lo cual fue inefectivo. Además, la barrera hematoencefálica suministra un obstáculo impenetrable para la terapia sistémica.

Sin embargo, los científicos están aprendiendo cómo vencer a estos obstáculos y en algunos casos el uso correcto de ellos proporciona una ventaja. Ocho pacientes han sido tratados en las primeras pruebas de terapia génica para el tratamiento de tumores cerebrales malignos en los Institutos Nacionales de Salud, (NIH) EE.UU., y posteriormente se ha reportado la expresión de genes

extraños en células cerebrales maduras de 2 meses de roedores, por parte de 2 grupos de investigadores.

Los protocolos de los NIH para el tratamiento de tumores cerebrales, aprobados en el mes de junio de 1992, por el Comité Consultivo de ADN Recombinante, y por la FDA (Food and Drug Administration) en el mes de diciembre del mismo año, ha involucrado una ingeniosa estrategia para la eliminación selectiva de células tumorales. El protocolo utiliza un retrovirus para deslizar dentro de las células tumorales el gen para timidina cinasa del *Herpes simplex*, de tal modo que suministra el blanco celular para la destrucción por medio del fármaco antiviral ganciclovir. Los retrovirus serán insertados con los genes únicamente dentro de células en división, y aún cuando estas propiedades los descalifican para su uso en terapias de células cerebrales inactivas, esto los puede hacer candidatos ideales para la terapia contra tumores. Los retrovirus usados en el protocolo son genéticamente alterados ya que ellos sólo pueden infectar a una célula una vez y liberar sus genes hacia el núcleo, no permitiendo la acción de su propia replicación

Un obstáculo que los investigadores encontraron tempranamente en el desarrollo del protocolo, fue que los retrovirus sobreviven unas pocas horas después de que son inyectados dentro del tumor cerebral. Para disminuir este problema, los investigadores inyectaron células de ratón modificadas por medio de la ingeniería genética, que fueron infectadas con el retrovirus. Estas células de ratón sobrevivieron de 2 a 3 semanas dentro del tumor y sirvieron como una fábrica de virus por la continua formación de los mismos. Los virus infectaron a las células tumorales vecinas e implantaron el gen de timidina cinasa en su núcleo.

Igualmente que la terapia génica para tumores cerebrales, la transfección de genes para células cerebrales inactivas tiene sus propios cambios y resultados. La habilidad para corregir genéticamente células del cerebro tiene un enorme potencial terapéutico -un 35% de los desórdenes genéticos heredados, tienen alguna implicación con el sistema nervioso central-.

Padecimientos causados por la falta o mal funcionamiento de proteínas cerebrales, como la enfermedad de Huntington; el síndrome de Lesch-Nyhan; la enfermedad de Gaucher, y los mucopolisacáridos son los primeros candidatos para la corrección por transfección de genes.

El más grande desafío, que ha tenido acogida, ha sido el encontrar un vector viral que no se replique, además que infecte células eficientemente sin efectos patogénicos. Investigadores están realizando experimentos en animales en esta área enfocado a un virus tipo 1 del *Herpes simplex*, pero se ha reportado una pobre eficiencia de infección y con efectos tóxicos. Hasta que recientemente, el gen de larga expresión de un gen extraño en el cerebro adulto ha sido recopilado por la alteración fetal de células cerebrales en el laboratorio y la transplatación de esas células dentro del cerebro. El trabajo se realizó con un adenovirus modificado, el cual tiene por blanco natural el epitelio respiratorio, y se logra su inyección dentro de regiones cerebrales específicas con la ayuda de un dispositivo estereotáxico. El virus fue genéticamente alterado para no replicarse, pero también acarrea un gen reportero para que los investigadores puedan fácilmente detectar esta expresión con ayuda de la histología (26).

3.1.5 LA TERAPIA GENICA PARA EL SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

Las terapias multimodales están dando la mejor esperanza para personas con VIH/SIDA, justo como en el tratamiento para el cáncer. El cáncer es tratado con la combinación de la quimioterapia, radioterapia, y la cirugía; el virus letal con la combinación de la quimioterapia y la inmunoterapia. Ahora una nueva arma puede ser bien añadida al armamento de ambos padecimientos: la terapia génica.

Un ejemplo ya contemplado en el tratamiento del SIDA, es un nuevo acercamiento para el bloqueo a las uniones de receptores CD4, con lo cual se previene la infección. La idea es introducir a los genes en el cuerpo para que inunden el sistema con moléculas iguales a CD4 que atraerán al virus y al mismo tiempo lo neutralizarán.

Intentos para realizar este engaño con moléculas CD4 solubles son infructuosas, debido a la variación del virus, -El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede mutar fácilmente para cualquier proteína que es específicamente designada para atacar y englobar glucoproteínas-. Ahora la esperanza es que la introducción de genes habilitados para interferir con el VIH en diversos puntos puede vencer este problema y continuamente frustrar al virus.

Un nuevo concepto que comienza a desarrollarse para la aplicación del VIH, es conocida como "la interferencia negativa dominante". El punto aquí es la inserción dentro del cuerpo de un gen que realice la proteína viral deseada, la forma de que haga únicamente la mitad de actividad normal de la molécula. Usando una proteína viral, la cual es constructora para tener una serie específica

de interacciones con otras proteínas virales y no necesariamente con proteínas celulares, lo cual incrementa la probabilidad que todo lo que es introducido trabajará únicamente contra el virus deseado.

Para combatir al VIH, se ha optado por una inserción poderosa de una forma infuncional de la proteína tat, la cual regula por encima de su forma normal la expresión de genes y la replicación a través de la interacción de otra parte del genoma viral. Insertados los genes tat falsos, podrán competir directamente con los genes reales tat uniéndose para el sitio de enlace viral; debido a que los falsos podrían sumamente exceder en número a los propios reales, el crecimiento viral podría cesar.

Otro acercamiento involucra el uso de la terapia génica para expresar permanentemente en la célula una opción de genes que destruya el VIH a nivel de ARN. Esto podría ser completado por la introducción segura de ribosomas. (28)

El Instituto Nacional de Alergias y Padecimientos Infecciosos (NIAID), de los EE.UU., con los acercamientos basados en SIDA, ha lanzado un programa para conducir la investigación de institutos junto con trabajos novedosos en estrategias basadas en inmunología.

El NIAID dedicará 25 millones de dólares para los próximos 4 años en el Programa Estratégico para la Investigación en el Tratamiento de SIDA (SPIRAT) para acercamientos tales como restauración del sistema inmune, terapia génica y vacunas terapéuticas basadas en ADN.

El NIAID es alentado con la participación de la industria en los nuevos acuerdos, y cuatro de seis de las investigaciones universitarias cuentan con el apoyo inicial de SPIRAT, y además tienen colaboradores corporativos; los equipos van a recibir cerca de 1 millón de dólares para un año por 4 años, con estudios tempranos en humanos para iniciar por el tercer año.

Los proyectos incluyen diversas técnicas para activar al sistema inmune, como la manipulación de células T, la adición de citosinas o la transfusión de células de hermanos donadores no infectados. Las estrategias de la terapia génica se pueden concentrar en un gen defectivo para el VIH en el uso de niños, y un gen antiviral para la producción de ribosomas que podrían inactivar parte del VIH. Un acercamiento basado en una vacuna podrían ser genes inyectados no infecciosos de VIH dentro de tejidos musculares de personas infectadas con el VIH (33).

Ciertamente, el conocimiento acerca del genoma del VIH ha traído consigo un rápido avance en los tratamientos clínicos de la infección misma, y el trabajo con el VIH claramente esta rompiendo un nuevo terreno en el campo de la terapia génica en vías iguales por tener un impacto mucho más lejos del tratamiento del SIDA.

El campo es igualmente benéfico dados los esfuerzos por el NIH y la FDA para la trayectoria de revisión de procesos, que es demasiado larga a través de los cuales los protocolos de terapia génica deben de ir hacia adelante. Un entendimiento ha sido alargado entre las agencias del RAC de los NIH, las cuales reservarán estas revisiones de procesos extra para protocolos con novedosos

acercamientos hacia la terapia génica, tal como el uso de nuevos vectores, o la misma terapia para un nuevo padecimiento.

Hay pacientes listos para comenzar a ser tratados con el último de 3 acercamientos en terapia génica. El Centro para el Cáncer en Seattle Washington, esta administrando células CD8(+) genéticamente alteradas a pacientes y revisando alguna evidencia de actividad antiviral. La Escuela de Medicina de Ann Arbor de la Universidad de Michigan, está recibiendo dinero del SPIRAT para dar a pacientes células CD4(+) monitoreadas con un gen mutante de VIH, *revM10*. Y la compañía Viagene Inc., de San Diego California, está patrocinando estudios de fase I en 3 ciudades con una cubierta del gen del VIH que, en pruebas animales, estimula a un linfocito-T citotóxico responsable contra el VIH.

Antes de comenzar la clonación, las células CD8(+) son transfectadas con un gen "suicida" especial ya que las pruebas animales sugieren que las infusiones de CD8(+) pueden inducir potencialmente inflamación fatal de pulmón y cerebro. El gen suicida es actualmente una combinación de 2 genes. Uno, para higromicina transferasa, que permite una selección de fuera de todas las células CD8(+) expandidas en un paciente. El segundo, el gen del *Herpes* virus tirosina cinasa, hace a las células CD8(+) altamente susceptible al ganciclovir, así que ellas pueden ser eliminadas con un tratamiento de dosis 500 veces más bajo de lo normal.

Una gran interrogante es cuan largo las clonas persistirán, dado que la replicación de CD8(+) requiere la presencia de células de cooperadoras CD4(+), las cuales son agotadas en infecciones establecidas de VIH.

Se han realizado pruebas con células transfectadas con un gen para la ribozima de gancho que abre un canal en el ARN viral para atacar el VIH en diversos ensayos de su ciclo de replicación, las cuales están listas para comenzar en la Universidad de California en San Diego, en donde está próxima la aprobación por parte de la FDA.

Los investigadores de la UCSD también planean realizar pruebas en donde se realice un ajuste en el gen de la ribozima dentro del progenitor CD34 en células del tronco obtenidas de la placenta y el cordón umbilical de infantes infectados con el VIH en el útero y reintroduciendo estas dentro de los infantes. Células del tronco obtenidas por esta vía son más capaces para insertar el nuevo ADN. Ellas son menos propensas de un ataque por el sistema inmune del hospedero, cuando se le dan a otro paciente (34).

El grupo que aconseja a la Comisión Europea en cuestiones éticas relacionadas a la biotecnología ha llamado a la comisión para hacer la investigación básica y clínica en terapia génica como una "prioridad". Estas recomendaciones son parte de una opinión en terapia génica hecha pública a mediados de diciembre de 1994, en la presencia de la comisión mencionada. Este grupo también menciona que más atención debe de ser concentrada para evaluar los riesgos y la eficacia de la tecnología. La publicidad popular sobre la terapia génica somática en pruebas riesgosas, solamente engañan al público en general. Además, se menciona que las pruebas son más "médicas que científicas" y frecuentemente dependen de pequeñas cantidades de datos preclínicos, en particular cuando las pruebas involucran pacientes con enfermedades terminales (35).

3.1.6 DEFICIENCIAS Y OTRAS ENFERMEDADES

A finales de 1992, el Comité Advisory de ADN Recombinante (RAC) del NIH, aprobó 3 propuestas independientes para comenzar pruebas limitadas para el padecimiento hereditario de pulmón, llamado fibrosis cística (CF); los inicios de una nueva era comienzan en investigación en terapia génica para enfermedades comunes hereditarias. Hasta ahora, la terapia génica ha sido enfocada mayormente en costosos acercamientos *ex vivo* para raras enfermedades, también incluidas ciertas formas de cáncer e inmunodeficiencias, no obstante el año de 1992 el RAC también aprobó ambiciosas propuestas para el tratamiento de cáncer de pulmón y de cerebro. En contraste, las ofertas de la CF llaman a la *directa administración in vivo del gen normal de CF encapsulado en el interior de un adenovirus como vector*. A pesar del temprano interés acerca de la seguridad de dichos virus y su eficacia (previniendo su replicación), el RAC aprobó los 3 protocolos unánimemente. Algunos expertos creen que la directa administración es necesaria para verificar el verdadero potencial de la terapia génica en estado clínico.

En los EE.UU. en por lo menos 25 clínicas, pruebas de terapia génica están en progreso, pero lejos de la aplicación general ya que cuentan con resultados mezclados. Esfuerzos para tratar raros desórdenes genéticos tales como la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) en niños, e hipercolesterolemia familiar (FH) en mujeres adultas son vistos con efectividad.

Investigadores europeos (tanto de Holanda e Italia), realizaron experimentos en los cuales lograron aislar células del tronco principal que prolongan la efectividad del tratamiento para la deficiencia de ADA. En Alemania,

se transfectó IL-2 dentro de fibroblastos antes de haberlas usando como vacuna para pacientes con cáncer (6).

Francia esta considerando algunos pasos para simplificar los procedimientos regulatorios para la terapia génica y alentar el extenso uso de la técnica en hospitales públicos, dicho así por el ministro de salud de aquel país. Las pruebas de terapia génica primeramente fueron aprobadas por el gobierno francés en el año de 1990, cuando el Comité Nacional Asesor Bioético concluyó que la terapia génica somática no poseía problemas éticos especiales. Pero como los protocolos para la terapia génica son manejados bajo la legislación existente, su aprobamiento recae bajo la jurisdicción de 4 diferentes comités.

Con la expectativa de demandas por incrementar, el gobierno francés consideró trayectorias alternativas del proceso. Pero el valor que tomó la larga ruta que transita en la nueva legislación específicamente centrada en la terapia génica, está considerando la creación de una comisión interministerial que pueda llevar el trabajo de los comités existentes.

El gobierno también intentó acercar centros pequeños de terapia génica para el país a través de hospitales, en una propuesta para trasladar las técnicas de terapia génica desde el laboratorio hacia el distrito del hospital.

Otra propuesta larga y calurosa es dirigida a pruebas clínicas rápidas y alentadas por grandes inversiones industriales en terapia génica; si es que el país puede establecer el equivalente de la US Orphan Drug Act. Bajo este acto, el cual fue mostrado en 1983, compañías que desarrollan fármacos para enfermedades

raras -definidas como aquellos que afectan no más de 200,000 personas- son otorgadas bajo estrategias comerciales y privilegios legales. (7)

Nuevamente Japón tiene otra decisión importante en el concepto de la aplicación de la terapia génica, cuando en una emergencia al norte del país, se presentó un niño de 3 años para el tratamiento de una deficiencia de una enzima, forzando el aprobamiento de la terapia génica. El propósito del tratamiento fue reparar la deficiencia de ADA, la cual provoca una caída del sistema inmune. La aprobación se llevó a cabo gracias al Comité Ético-Médico de la Universidad de Hokkaido, en el departamento de pediatría de dicha universidad. La realización del tratamiento anterior, obligó al gobierno japonés a implantar un sistema de protección de dichos experimentos y su posterior aprobación en todas las universidades del país (10).

Por otra parte, un astuto y fuerte programa ha surgido en Inglaterra en cuanto a biología molecular y genética; el gobierno está planeando una estrategia nacional para la investigación del genoma humano, diseñado sobre las habilidades e intereses de científicos universitarios, comités investigadores, beneficencias médicas y la industria farmacéutica. El primer experimento aprobado en terapia génica en esta nación se logró en el mes de enero de 1993.

Con la aprobación del primer experimento en la materia, se logró conjuntar los esfuerzos del gobierno, apoyados por el Comité Investigador Médico (MRC) y el Comité Investigador en Genoma Humano, y el trabajo de la iniciativa privada, con la inclusión de las áreas de investigación de 4 grandes compañías farmacéuticas británicas como son, Glaxo, ICI, SmithKline Beechman y la Fundación Wellcome, para crear un Comité Consultivo.

Al mismo tiempo en que se dió inicio la terapia génica en Inglaterra, en el Instituto de la Salud del Niño de la Universidad de Londres; comenzó un trasplante experimental para el tratamiento de la deficiencia de ADA dentro de células de la médula ósea de un niño que sufría de inmunodeficiencia severa combinada (SCID).

Similares experimentos han sido desarrollados en los EE.UU. e Italia, pero en estos casos, únicamente células T son alteradas y el proceso tiene que ser repetido en intervalos regulares. Sin embargo, la técnica británica se llevará a cabo involucrando la manipulación de células del tronco como fuente de células T, con lo que, si es exitosa la técnica, resultará en una de las primeras implantaciones de permanencia de un gen humano manipulado.

Los experimentos de ADA son iniciados después de la decisión realizada por el Comité Consultivo en Terapia Génica, el cual no tiene objeciones éticas para los experimentos, no obstante se haya enfatizado la necesidad de un monitoreo cerrado del paciente en progreso (15).

El Comité Investigador Médico Británico (MRC) está dirigido por un comité para estimular la terapia génica en Inglaterra, y ha nombrado a 20 miembros para integrar el comité entre científicos académicos e industriales y oficiales del gobierno para promover la investigación y su aplicación en el campo. Dos tercios de miembros del comité son científicos que trabajan en universidades, laboratorios de fundaciones de caridad e investigadores de institutos pertenecientes al comité. Otros incluyen representantes de las compañías farmacéuticas Glaxo y Zeneca, y oficiales de la Agencia de Control Médico y el Departamento de Salud. El comité no incluye expertos independientes en medicina ética, por lo tanto el MRC refleja

así su convencimiento sobre la responsabilidad para la regulación de la terapia génica apoyado por el Departamento de Salud.

Uno de los nuevos comités atareados primeramente -la división de Medicina Molecular y Celular del Comité Investigador Médico-, centrará sus esfuerzos al colocar fondos para un número de centros de universidades basados en terapia génica bajo una iniciativa del gobierno en acercamientos genéticos para la salud humana; más de 30 perfiles de propuestas han sido recibidos desde las aplicaciones que fueron comenzadas a inicios de 1993.

Diversos experimentos en terapia génica con aplicación a la fibrosis cística están en progreso en los EE.UU., usando como vectores adenovirus, sin embargo, se han publicado reportes que indican que algunos de esos vectores caen dentro de un rango de dificultades relacionadas con la patogenicidad viral. Los investigadores británicos tienen la esperanza del uso de liposomas que abrirán más rutas benignas para un exitoso tratamiento, respondiendo sobre un escepticismo sobre la viabilidad de liposomas como una alternativa a los adenovirus, por sugerencia de que la terapia óptima puede eventualmente ser girada fuera de las combinaciones de los acercamientos más recientes (16).

En el mes de agosto de 1993, un grupo de científicos británicos comenzaron a realizar la primera prueba de terapia realizada en el mundo que utiliza la técnica de liposomas, bastante más eficientes que los virus para transferir fragmentos de ADN, en este caso la versión de trabajo para la terapia cuya disfunción causa fibrosis cística.

Lo más reciente explica que todos los demás intentos pertinentes causados en los EE.UU. para usar un adenovirus atenuado para la terapia génica de pacientes con fibrosis cística (CF), corren con problemas inesperados. En particular, una prueba de los Institutos Nacionales de Salud, Nacional del Corazón, Instituto del Pulmón y Sangre (NHLBI) han sido detenidos después de que un paciente desarrolló inflamación del pulmón.

Investigadores además reportan de que aún cuando los adenovirus son vías altamente eficientes de introducción de genes en la primera aplicación, el nivel de expresión genética a veces decae prontamente en aplicaciones subsecuentes. Consecuentemente, investigadores están observando cerradamente el experimento británico, debido a que puede proveer la primera comparación de seguridad y eficacia en ambos acercamientos. Dado el vasto mercado potencial de un fármaco para la CF, se ha mencionado que los 2 acercamientos corren una carrera al igual que caballos por una cantidad de 600 millones de dólares.

En las pruebas británicas los genes son encapsulados en liposomas. Se logra la fusión con la membrana de la célula y se descargan los genes dentro de la célula. La técnica trabaja con ratones criados con deficiencia de genes de CF.

En la primera etapa, los liposomas serán administrados por nebulizaciones nasales para nueve jóvenes voluntarios varones para probar si la técnica es segura y efectiva. Si lo es, entonces el atomizador será administrado directamente para los pacientes del pulmón.

Grupos en los EE.UU. están planeando pruebas similares, siguiendo las exitosas introducciones del funcionamiento de genes de CF dentro de *Mono rhesus* usando liposomas (19).

Desórdenes hereditarios causados a una familia y atendidos por el Centro Universitario de Medicina en Pennsylvania en los EE.UU., muestran los resultados de un defecto en los genes que codifican para receptores de baja densidad de lipoproteínas (LDL) de células del hígado. Aproximadamente 1 de cada 500 personas en los EE.UU. es heterocigótico para los genes defectivos y los niveles de colesterol en el suero son de un rango de 7.75 a 10.35 mmol/l (300 a 400 mg/dl). Sobre uno de cada 1 millón de estadounidenses es homocigoto para el mal de absorción de genes y es masivamente elevado el nivel de colesterol en suero, usualmente entre 12.95 y 25.85 mmo/l (500 y 1000 mg/dl). Las personas frecuentemente sufren su primer ataque antes de los 10 años de edad.

Los protocolos de terapia génica se manejan de la siguiente manera: aproximadamente el 15% de los pacientes de hígado son reseccionados. Células del hígado son aisladas, aumentadas en tamaño, y expuestas a los retrovirus producidos por la ingeniería genética para conducir el gen normal del receptor de LDL. Las células del hígado son alteradas genéticamente, por consiguiente son introducidas de nuevo dentro del paciente a través de un catéter. En el procedimiento para el tratamiento de hipercolesterolemia se está manejando de manera similar al tratamiento de fase I para la fibrosis cística (CF), la cual utiliza adenovirus manejados por medio de la ingeniería genética para conducir los genes correctos dentro del paciente de pulmón a través de un broncoscopio (21).

En el mes de junio de 1992, investigadores de la Universidad del Centro Médico de Michigan, Ann Arbor, EE.UU., removieron quirúrgicamente el 10% del hígado de un paciente. En el laboratorio los investigadores cultivaron los hepatocitos y los transfectaron con retrovirus modificados que contenían el gen del receptor de LDL. El retrovirus insertó el gen, y el resto del material genético lo añadió en un sitio aleatorio del cromosoma del hepatocito. Después de 3 días, los investigadores vaciaron las células reparadas dentro de la vena porta a través de un catéter insertado en el tiempo que duró la cirugía. Se esperaba que las células se implantaran y comenzaran a expresar el receptor para las LDL. Antes de aplicar la terapia, el paciente tenía un rango de colesterol de 12.93 a 16.81 mmol/l (500 a 650 mg/dl). Desde que la terapia génica se ejecutó, la concentración de colesterol ha fluctuado entre 20% y 40% abajo de los niveles de la preoperación sin la asistencia de fármacos que disminuyan los niveles del mismo. Una biopsia posterior al tratamiento indica que el gen está operando dentro del paciente (22).

Un poderoso entendimiento un día puede venir a formas prácticas de terapia para la condición de padecimientos cardiovasculares, los cuales resultan cuando el músculo cardíaco no se puede contraer con suficiente poder para circular sangre eficientemente. No obstante la falla congestiva del corazón puede ser tratada con agonistas de la adrenalina, los pacientes del corazón responden débilmente a ambos, para los fármacos y a la adrenalina misma. Y como el corazón continua debilitándose, los fármacos pueden convertirse cada vez menos efectivos. Pero un grupo de trabajo de la Escuela de Medicina de la Universidad de Duke en los EE.UU., sugirió que puede ser posible reducir -incluso eliminar- el uso de fármacos en la terapia introduciendo copias en excedente del gen para el receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) dentro de la falla del corazón.

Para sus primeros experimentos, el grupo de la Universidad de Duke, introdujeron dentro de un ratón el gen para un β_2 -AR mutante que constantemente envía las señales para el interior de la célula, las cuales podrían ser las más eficientes vías para ayudar al corazón. De cualquier modo, estos corazones de animales no tuvieron los suficientes receptores mutantes. Se propuso que las células del corazón no podrían tolerar al receptor mutante, por lo que estos investigadores introdujeron al gen normal β_2 -AR dentro de otro lote de ratones -con muchos y mejores resultados-. Estos animales mostraron en cualquier parte un 100 a 200% del doble de incremento en la expresión de β_2 -AR, así como a alta expresión del gen β_2 -AR correlacionado con el incremento en la contractibilidad del músculo cardíaco. Ya que los animales no han tenido contacto con la adrenalina, el grupo se pregunta cómo el receptor solo puede incrementar la contractibilidad.

Una posibilidad es que el exceso de receptores estuvieran permitiendo al corazón responder a niveles bajos de adrenalina endógena. Sin embargo, cuando se les administraron a los animales fármacos que bloquearon la habilidad a los receptores para responder a la adrenalina, el corazón continuó bombeando duramente. El grupo concluyó que un pequeño porcentaje de los receptores siempre estaban enviando mensajes hacia el interior de la célula, incrementando el número total de receptores que funcionan en un mínimo, con lo que los animales pueden tener un gran número de receptores activos (23).

El haber limpiado una arteria coronaria bloqueada, garantiza que no se va a obstruir otra vez. El flujo de sangre a las vesículas colaterales para protección extra de la circulación, puede tornarse en un procedimiento simple cuando la terapia génica sea aplicada al corazón humano. Esta posibilidad ha sido

manejada por el Departamento de Cardiología de la Universidad de Chicago, quienes son pioneros de la terapia génica somática en padecimientos cardiovasculares. La terapia génica somática es aquella en la que copias normales de genes son introducidas dentro de las células apropiadas para tratar un desorden específico por el reemplazo de genes anormales, la cual puede ser tomada en cuenta para un tipo nuevo de tratamiento farmacológico.

Esto puede acarrear el que no se tenga ningún cuidado ético de la terapia génica en la línea germinativa; otro tipo de manipulación biológica en la cual se introduce el material genético que convierte la parte de un marcaje genético individual, en que puede ser pasada dentro de la línea genética celular. El propósito de la fundación de la terapia génica somática es la identificación y clonación de genes, escogiendo la célula del tipo apropiada para aceptar, desarrollar y liberar un sistema que contenga el gen dentro de la célula, y creando un mecanismo para el control de la expresión de un gen en el cuerpo humano.

El material genético puede ser introducido dentro de las células apropiadas directamente *in vivo* y procesado ahí mismo, siendo la inyección de ADN en el músculo esquelético o en el cardíaco. El método utiliza una forma de adenovirus que expresa los genes recombinados y que puede infectar únicamente una célula a la vez, por un alto título de la solución inyectada vía catéter dentro de la arteria coronaria o seno coronario. La ventaja clara es que se necesita menos de un procedimiento invasivo, pero mucho más personas pueden potencialmente recibir este tratamiento.

Otro grupo de investigadores han reportado que la introducción de ARN antisentido -una pequeña pieza sintética de ARN (un oligonucleótido) que es

complementario para el proto-oncogen MIB -implicado en la regulación celular- dentro de las paredes de la célula, detiene la proliferación de las células del músculo liso provocando restenosis en las arterias coronarias seguida de una angiospatía (24).

El gen defectivo de la fibrosis cística (CF) -el gen responsable fue identificado en el año de 1989-, es el llamado regulador de la conductancia de la fibrosis cística (CFTR) y es expresado en el epitelio en diversos órganos. El pulmón ha sido el blanco inicial para la terapia génica de la CF ya que los padecimientos pulmonares -caracterizados por la obstrucción de los conductos del aire, infecciones recurrentes, y últimamente fallas respiratorias- son las más serias y limitantes de la vida. Últimamente unas cuantas vías pueden hacer frente a la expresión de reconstrucción de genes por inhalación del gen recombinante constructor, pero complejidades en la biología de los padecimientos pulmonares afirman singulares desafíos. El gen de la CF es regulado de manera altamente específica por una célula en el pulmón de un adulto humano; es productivo -el CFTR- por el momento expresado en subpoblaciones de células por todo el epitelio superficial de ambos conductos del aire y vías superiores, así como en células de las glándulas de las submucosas. Puede ser muy difícil para reconstruir de manera precisa la expresión normal del gen de la CF usando las técnicas disponibles de transfección de genes, no obstante puede ser necesario para realizar un tratamiento clínico. Otra consideración es la estabilidad de la expresión de genes recombinantes en el receptor -hasta que las células progenitoras responsables de la población del epitelio pulmonar sean identificadas y hechas accesibles para la transfección de genes, para pacientes que probablemente requerirán repetir el tratamiento-.

El acierto primario en la investigación de la terapia génica para la CF en sectores, tanto comercial y académico, es el desarrollo de un vehículo para la liberación normal del gen para la CFTR directamente dentro del pulmón. Las demandas de este producto serían altas. Es más eficiente la transfección de genes dentro de células indivisibles del epitelio de los conductos del aire en una manera que sea segura y técnicamente práctica. Además, la expresión de genes recombinantes debería ser programada, y el vehículo no debe ser inductor de una respuesta inmune.

En principio, los adenovirus recombinantes tienen las propiedades biológicas para tales vehículos. Esta familia de virus, que normalmente causa infecciones del tracto superior respiratorio, pueden ser modificados para la terapia génica por el reemplazo de un gen que controla la replicación viral (*E1a* y *E1b*) con un minigen normal (CFTR). Experimentos en la rata del algodón, un animal que se asemeja al hombre con respecto a la biología de adenovirus humanos, han mostrado que los adenovirus recombinantes pueden realmente transfectar genes de CFTR recombinantes a las células de las vías respiratorias. El epitelio humano de la CF reconstruido *in vitro* ha ayudado a demostrar eficientemente la transfección de genes mediados por adenovirus y la corrección de las propiedades bioeléctricas del epitelio.

Se han descrito resultados de pruebas clínicas en las cuales adenovirus recombinantes, que contienen el gen normal de CFTR, fue introducido dentro del epitelio nasal de 3 pacientes con CF. La razón para la evaluación de las consecuencias de la transfección de genes en la nariz, es debido a que el epitelio nasal es una extensión del epitelio del pulmón y es accesible para la cosecha de células y el desarrollo directo de las mediciones de funciones correspondientes. El

defecto en el transporte de cloruros, es medido por voltajes transepiteliales, los cuales fueron corregidos en 3 pacientes.

La transferencia de genes mediada por liposomas ha emergido como otra promisorio vía de tratamiento para el padecimiento de la CF pulmonar. Diversos grupos han usado modelos de ratón de CF generada por la mutación directa *in situ* de los genes de CFTR en células del tronco de embriones, para evaluar la eficacia biológica del complejo ADN-liposoma.

En ambos estudios, la conductancia de cloruros mediado por AMPc, el cual es reducido en CF de ratón y de humanos, fue como mínimo parcialmente corregida. Mediciones de transporte de cloruros en estos estudios no son fáciles, porque el ratón en general tiene una conductancia de cloruros independiente a CFTR (25).

La hemofilia B es un desorden de la cadena X en la coagulación de la sangre, resultado de una deficiencia de la producción del factor IX en el hígado. La enfermedad afecta a 1 de 30,000 hombres y puede resultar en severos episodios de sangrado que requieren infusiones de productos de la sangre que contengan el factor IX. Como un resultado de una terapia previa de reemplazo de proteínas humanas, sobre una media de pacientes con hemofilia B son infectados con el virus de inmunodeficiencia o virus de hepatitis; un producto libre de virus y el factor IX notrombogénico son ahora estudiados, pero debido a los altos costos del tratamiento, los protocolos no incluyen profilaxis y la terapia es iniciada después de que el sangrado comienza. Un gran número de tejidos son los órganos blanco para una terapia génica somática de la hemofilia B, incluidos los fibroblastos, mioblastos, células endoteliales, queratinocitos y hepatocitos. Ya que

el hígado es el órgano sintetizador del factor IX, representa un blanco natural para la terapia génica de reemplazo.

Se ha reportado de que hepatocitos pueden ser transducidos *in vivo* por infusión de vectores retrovirales recombinantes dentro de la vascularización portal de un ratón después de hepatectomía parcial. Para determinar si es el mismo gen que pueden ser retenidos en animales más grandes (como perros), el equipo de investigadores (constituido por miembros del Colegio de Medicina de Houston Texas, EE.UU.) introdujeron un vector viral amfotrófico (LBGpgk) que transporta al gen para β -galactosidasa de *Escherichia coli* directamente dentro de la arteria portal de perros normales 3 veces a cada uno por 3 días después de la hepatectomía parcial. Dos semanas después, los hepatocitos fueron aislados y teñidos; las secciones del hígado de estos animales fueron similarmente analizados. La porción de células que fueron teñidas representa la transducción frecuente de hepatocitos y fue entre 1 y 0.3% en dos animales. La eficiente transducción es similar a la previamente observada en ratones; análisis histológicos rutinarios revelaron inexistentes condiciones patológicas en el hígado (29).

Desde la clonación de genes de la distrofia muscular, uno de los más grandes aislamientos hasta la fecha, la distrofia muscular de Duchenne (DMD) ha tenido el más grande interés como blanco para la terapia génica. La enfermedad aflige a 1 de 3,500 niños cada año y es la más severa de las distrofias musculares, causando desgaste muscular progresivo y muerte hacia la edad de 20 años. No obstante que la clonación de los genes ha revolucionado los diagnósticos, el único tratamiento disponible para los pacientes de DMD es

paliativo. De aquí lo atrayente del empleo de genes de remplazo como una potencial terapia

Existe evidencia reportada en la que se indica que la expresión de un gen recombinante, que codifica la proteína extraviada, la distrofina, puede prevenir la destrucción del músculo y preservar la función del músculo en un modelo animal de distrofia muscular (30). La información obtenida menciona que en un ratón *mdx* (al igual que los pacientes con DMD, tienen una aberrante distrofia de genes) la sobreexpresión de una cadena de distrofina complementaria a lo largo del ADN, no únicamente dirige para una fibra morfológica de un músculo normal, sino también para una fuerza y poder normal en el diafragma, resultando así de un particular interés para el fallo respiratorio, la causa principal de muerte en el hombre.

En ratones transgénicos están presentes en 50 veces los niveles normales de distrofina sin efectos adversos; ordinariamente la distrofina se encuentra únicamente en un 0.002 por ciento del total de las proteínas del músculo esquelético. Estos niveles bajos pueden ser asegurados por el tamaño de 2,300 Kb del gen desde la cual una singular transcripción es probablemente producida cada día. La severidad del padecimiento se muestra para depender en parte a la cantidad de distrofina, debido a una pequeña cantidad o la ausencia de proteínas en DMD, aunque dados los niveles intermedios de distrofina, se asocian más con la distrofia muscular benigna de Becker.

Una acercamiento alternativo para el reemplazo de genes es la transplantación de mioblastos. Esta presenta la ventaja de que los genes completos de la distrofia pueden ser liberados con las secuencias regulatorias intactas, con lo cual se garantiza que diferentes transcripciones y proteínas serán

producidas en el tiempo apropiado. Los acercamientos fueron estimulados por estudios animales, los cuales indican que inyecciones de mioblastos cruzan la barrera basal y regresan en partes íntegras de fibras musculares maduras del hospedero.

Las estrategias de la ingeniería genética diferentes a las del reemplazo de genes, pueden ser contempladas en donde se podría compensar para la carencia de distrofina en DMD. Por ejemplo, para sobrerregular genes en autosomas que codifiquen moléculas iguales a la distrofina, tal como la utrofina, que es normalmente expresada en el desarrollo temprano pero, como la distrofina, es conjuntamente localizada con DAGs (distrofina asociada a glicoproteínas) en la unión neuromuscular.

Otros estudios se han enfocado a inducir un modelo alternativo de unión de ARN de distrofina, cuyos cambios se llevarían a cabo en la fabricación de lecturas que reditúen en proteínas cortas y funcionales. Un mejor entendimiento del responsable inflamatorio, la naturaleza y el papel de los canales de calcio, y otros mecanismos que guíen a la degeneración del músculo y muerte de las fibras en DMD, podrían ser explotadas para preservar la función de las fibras musculares en la ausencia de distrofina (31).

El Comité Consultivo de ADN Recombinante (RAC) de los Institutos Nacionales de Salud, de los EE.UU. está instalando un subcomité para considerar las ediciones éticas iguales a las levantadas por la terapia génica en fetos.

Una de las más importantes ediciones publicadas en noviembre de 1994 fue sobre el balance entre los riesgos y beneficios de las alteraciones genéticas

de células de la línea germinal (espermatozoides y óvulos) que podrían recaer, como resultado, ser pasadas en subsecuentes generaciones.

En el presente, las pruebas de terapia génica son permitidas únicamente en células somáticas en adultos y niños y cualquier cambio son por lo tanto no hereditarios.

En línea con esta práctica, los primeros protocolos para la terapia génica fetal son igualmente para células somáticas, aunque la División de Investigación Inmunológica en el Hospital Infantil de Los Ángeles ha mencionado que los escenarios tempranos en desarrollo prenatal son de mucho mayor riesgo que un vector que entrará en todas las células -incluyendo células germinales-. De hecho, un reporte hasta ahora no ha publicado, muestra que un nuevo material genético introducido en las células del útero de un cordero son pasadas a sus crías.

La terapia génica fetal puede ser de gran valor para enfermedades en que el daño es irreversible antes del nacimiento o tengan un valor alto de la mortalidad fetal, además es una opción en el caso de que la mujer no tenga el deseo a un proceso abortivo (32).

4. CAPITULO TERCERO

4.1 TERAPIA GENICA EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER

La introducción de nuevas técnicas, para el tratamiento en contra de males que a menudo disminuyen el tiempo de vida normal de un paciente, es ahora una realidad. Con la creciente necesidad de desarrollo de fármacos oncogénicos, la terapia génica se presenta como una opción a no muy largo plazo para la ayuda al combate en contra del cáncer, lo que representa una enorme y valiosa aportación al desarrollo científico.

Sin lugar a duda, el desarrollo tecnológico tiene un significado trascendental en el desempeño de la ciencia en favor del bien común.

A través de los años se han buscado técnicas aplicables para el tratamiento del cáncer y otros males generalizados, iniciando por la amputación de miembros y finalizando hasta la radioterapia, pasando por la quimioterapia y la extirpación de los cuerpos oncogénicos. Ahora se presenta la oportunidad de contrarrestar al cáncer con otro tipo de herramienta, la cual se describe a continuación.

Los glioblastomas son los más comunes de los males primarios de tumores cerebrales, el cual es considerado incurable. Acercamientos multimodales actuales, contribuyen en una pequeña cantidad al prolongamiento de la vida media de los pacientes (de 9 a 12 meses). La infección preferencial e integración de retrovirus dentro de células en división, ofrece un único mecanismo para la ubicación del blanco de la transfección de genes en el tumor con la destrucción de células de gliomas de las contagiosas, de esta manera, el cerebro, el cual no se puede regenerar, es protegido. Este sistema utiliza transfección de genes *ex vivo* con citosinas o genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para

inducir una regresión tumoral mediada inmunológicamente. Se trata de un acercamiento en el uso de genes "suicidas" de susceptibilidad a fármacos para la destrucción selectiva del tumor. Estos sistemas de transfección utilizan vectores retrovirales incapaces de replicar, que son continuamente liberados por acciones de la ingeniería genética para producir líneas celulares.

En un esfuerzo por desarrollar métodos de transfección de genes *in vivo* para el tratamiento de males localizados, el equipo de neurocirugía del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y el Centro Clínico Stroke, en Bethesda Maryland, dirigidos por el Doctor Zvi Ram, han realizado experimentos para el tratamiento de tumores cerebrales con la transfección *in situ* de genes mediado por retrovirus.

El equipo de neurocirujanos afirma que se tiene un efecto antitumoral, si se inyectan directamente células productoras del vector timidina cinasa del *Herpes simplex* HStk, dentro de cerebros de ratones en crecimiento. Se tienen resultados preliminares en los cuales se realizó la transducción *in vivo* de tumores cerebrales con el gen HStk en un modelo murino. En este experimento la inyección de 3×10^6 células productoras de HStk, seguido por tratamiento con altas dosis de ganciclovir (300 mg/kg/día), indujo la regresión de HStk transducido en tumores en 11 de 14 animales tratados, comparados al 100% de incidencia en los controles. El ganciclovir es fosforilado por la timidina cinasa para producir trifosfatos tóxicos, los cuales interfieren con la síntesis de ADN tumoral, resultando en la muerte preferencial de las células tumorales transducidas (36).

Al igual que el equipo de investigadores anteriores se han esforzado por encontrar una solución que brinde una esperanza en contra del cáncer, se han

descrito otros experimentos extremadamente similares en distintas regiones de la unión americana. (43)

Extrapolando los resultados obtenidos, la aplicación hacia una terapia en humanos debe ser evaluada para los posibles candidatos, ya que la forma activa del fármaco antiviral es tóxica en altas concentraciones. Sin embargo, significa el paso inicial de una terapia de manipulación *in vivo* para los genomas tumorales.

Aplicaciones de "terapia génica de citosinas en células tumorales ubicadas" (manipulación genética de células tumorales para producir citosina) han comprobado provechosamente la determinación del potencial de esta terapia antitumoral en sistemas animales. Este acercamiento ha sido usado exitosamente para investigar los efectos antitumorales de IL-2 (interleucina 2), IL-4 (interleucina 4), IFN- γ , (interferón- γ), TNF (factor necrosante de tumores), y factor estimulante de colonias de granulocitos.

La transfección de genes de citosina a células tumorales como blanco puede sobreponerse a algunos de los inconvenientes prácticos del tratamiento sistémico de citosina (por ejemplo, corta vida media, dificultad para obtener la dosis óptima para el sitio del tumor, toxicidad, etc.). Al desarrollar esta clase de experimentos, un grupo de investigadores europeos constituidos por miembros del Laboratorio de Virología, del Istituto Superiore di Sanità, de Roma Italia y el Laboratorio de Oncología Viral, del Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer de Francia, dirigidos por la Doctora María Ferrantini, comprobaron la efectividad de diferentes citosinas en ratones con células de leucemia "amigable" (FLC). En este sistema particular de tumores, se repiten altas dosis de

inyecciones de IFN- α/β , siendo altamente efectivo en la inhibición del crecimiento del tumor en los ratones. (37)

Las células FLC fueron transfectadas con un vector retroviral que contiene el gen de IFN- α , el cual se llega a producir en cantidad considerable. Por otra parte, inyecciones colaterales de las células productoras de IFN dan como resultado el mismo efecto antitumoral que se tiene con la inserción del gen dentro de los ratones. Al desarrollar así esta técnica, se verificó la tumorigenicidad que tiene el FLC al llevar un grupo control de animales a los cuales se les introdujo anticuerpos anti-IFN, con lo cual se realizó la importancia de las citosinas en la terapia génica. Sin embargo, este tipo de terapias como muchas más, resultan ser innovadoras para la creciente demanda de alternativas al tratamiento del cáncer.

La identificación de factores solubles como moduladores de la respuesta inmune han guiado a su incorporación misma en los protocolos designados para aumentar a respuesta inmune antitumoral. Por ejemplo, la administración sistémica de IL-2, sola o en combinación con otros tratamientos, tiene profundos efectos inhibitorios en tumores progresivos de animales experimentales, pero únicamente limitados beneficios terapéuticos cuando son administrados a pacientes con cáncer. La limitada eficacia de IL-2 en la inmunoterapia para el cáncer es debido en parte a la toxicidad de la misma, resultado de la necesaria administración de las altas dosis de la citosina al paciente.

El Servicio de Urología y el Programa de Biología Molecular del Centro contra el Cáncer Sloan-Kettering en Nueva York, dirigido por el Doctor John Connor, propuso un desarrollo para la regresión de tumores de vejiga en ratones tratados con células tumorales modificadas genéticamente para producir IL-2. Los

tumores de ratones utilizados en este experimento fueron MBT-2 como buenos modelos de tumores de vejiga en humanos. La IL-2 humana y los genes del IFN- γ se introdujeron por medio de vectores retrovirales y fueron expresados en las células MBT-2. La capacidad de formación de tumores por parte de los genes modificados de citosina de las células MBT-2 fue significativamente disminuída: desde entonces no hay tumores formados en el ratón inyectado con células secretoras de IL-2 o IFN- γ . En el 60% de los animales tratados, el tumor es cesado completamente y los animales permanecen vivos y libres de tumores detectables en la duración de un período de observación. Tratamientos de animales con carga tumoral y además células MBT-2 secretoras de IL-2, fue superior al uso de cisplatina, un agente quimioterápico usado en el tratamiento de cáncer de vejiga (38)

En los últimos años se ha tenido un interés especial hacia las citosinas como medio para recurrir al tratamiento del cáncer por acción del sistema inmune. Recientemente se torna la atención hacia la IL-12, para estimular la inmunidad antitumoral sistémica. La IL-12, originalmente denominada factor estimulador de células naturales asesinas (NKCSF), hace que significativamente mejore la actividad citotóxica de las células NK; es normalmente expresada por macrófagos y linfocitos B. La IL-12 es viable para facilitar una respuesta citotóxica de linfocitos T (CTL), para actuar como un factor de crecimiento para ambas células activadas, T y NK, o bien para estimular la producción de IFN- γ de células T y NK. En adición, se ha demostrado que estimula la diferenciación y expansión de células TH1, un subgrupo de células T inductoras. Linfocitos TH1 producen IL-2 e IFN- γ y están involucradas en una respuesta inmune mediada por células, en contraste con las células TH2, las cuales producen IL-4, IL-5, e IL-10 que enfocan su

cooperación a la inmunidad humoral. Estos variados efectos de IL-12 sugieren que podría ser un potente estimulador de la inmunidad antitumoral.

El vector retroviral usado como vector inicial para la expresión de IL-12 activada biológicamente fue desarrollado por los Drs. P. Robbins, y B. Guild del Departamento de Genética Molecular y Bioquímica, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pittsburgh. Este vector ha sido utilizado para expresar diversos productos de genes, incluyendo citosinas en altos niveles. El vector MFG es un vector simplificado que contiene una región del gen *gag* (*gag-medio*) para incrementar la concentración viral, el aceptor unido *env*, y sitios de clonación 5'NcoI y 3'BamHI para la inserción del gen terapéutico. El gen terapéutico de interés es insertado dentro de MFG pero donde el codón inicial de translación es fusionado al ATG del gen viral *env*. La inserción del gen es codificada por un conductor unido de mensajes LTR que aparece para ser eficientemente traducido. Sin embargo, esto no es un promotor adicional para dirigir la expresión de un segundo gen insertado. Por lo tanto, para expresar dos genes en el mismo vector MFG, el sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) para el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) fue insertado dentro MFG. Las secuencias de IRES permiten a los ribosomas ensamblarse, e iniciar la translación por un mecanismo interno de ATGs sin ARNm y de este modo permitir la translación de dos genes codificados por un mensaje sencillo. (39)

El uso de anticuerpos para el blanco de células cancerosas y su terapia, ha emergido como una mayor área experimental en investigación clínica. Estudios de potenciales aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales (mAb) han sido enfocados principalmente en dos áreas. Una involucra el uso de anticuerpos como vehículos de liberación de agentes citotóxicos tales como fármacos, toxinas,

y radionucleótidos; no hace mucho tiempo que las otras áreas toman ventaja de la función efecto o de propiedades antigénicas de anticuerpos para actuar en concierto con otros elementos del sistema inmune del hospedero. Estudios en diversos laboratorios han mostrado que las regiones variables del heterodímero del receptor de células T (TCR) puede ser sustituido con unas de las cadenas ligeras y pesadas de las regiones variables de la inmunoglobulina (Ig) para reasignar nuevas especificidades a células T, del mismo modo como ha sido mostrada con anticuerpos bioespecíficos. De este modo, la transfección de genes quiméricos TCR-mAb a líneas de células T e hibridomas guían para la aparición de receptores quiméricos en la superficie de la célula, con lo cual, una reacción con el antígeno, resulta en una activación de células efectoras y asesinas de células blanco no restringidas por el MHC. Una de las ventajas potenciales del uso de linfocitos que han sido modificados con los genes quiméricos TCR-mAb para inmunoterapia adoptiva, es la producción de aún más la población homogénea de efectores que contengan un alto porcentaje de células reactivas asesinas de tumores. Esto es en torno a los bajos requerimientos para una terapia de citosinas.

Los estudios realizados por el grupo de investigadores de la División de Inmunología, del Instituto de Investigación Beckman de la Ciudad de la Esperanza, Duarte California, encabezados por el Dr. F. James Primus, demuestran que la administración exógena del mAb D612 en ratones atímicos (desnudos) que sufren de implantes tempranos de carcinoma de colon humano de xenotransplantes, producen marcada inhibición del crecimiento tumoral. No obstante la actividad tumorocida requiere relativamente altas dosis de mAb, únicamente una dosis fue necesaria para inhibir el crecimiento del tumor. La observación de que las células del carcinoma transducidas con genes de mAb

codifican para un anticuerpo que puede participar en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), sensibiliza la citotoxicidad celular mediada por el receptor de la fracción cristalizable (FCR), lo cual sugiere que en su crecimiento también puede ser inhibida *in vivo*. El crecimiento del tumor fue comparado entre el ratón atímico donde se implantó la línea celular de carcinoma de colon con los genes de la cadena ligera y pesada del D612 (LS-174T), y los ratones que no se transdujeron o que fueron transfectados con las células tumorales que contenían la cadena ligera únicamente. No hubo términos largos de supervivencia en animales implantados con células transducidas LS-174T y ambos genes mAb D612, tuvieron una significativa ventaja en la supervivencia en los ratones implantados con las posteriores células. De este modo, aún cuando el nivel de la producción de mAb por las células tumorales transducidas es bajo, el deterioro del crecimiento observado en esas células *in vivo* es similar al que se obtuvo siguiendo el tratamiento del carcinoma no modificado con xenotransplantes con administración sistémica de mAb D612.

El experimento anterior demuestra que las células tumorales son capaces de producir la reactivación por sí mismas de anticuerpos siguiendo la transfección de genes mAb. (40)

Recientemente se ha observado que células C6 de glioblastomas de rata transfectadas con un vector episomal de expresión, producen antisuero igual a la insulina del factor I de crecimiento (IGF-I), el ARN pierde tumorigenicidad e induce una reacción inmune mediada por células T, ambas contra sí mismas y en contra de sus células progenitoras tumorigénicas no transfectadas, en animales singénicos. Derivaciones de cultivos de células C6 expresan altos niveles de IGF-I o IGF-II, en donde las primeras se manifiestan, como muchas otras, como

tumores malignos primarios humanos. Es de modo importante imponer la generalidad del efecto del antisuero de IGF en la inmunogeneicidad de tumores en orden para ayudar a evaluar este potencial clínico. En adición, IGF-II es considerado para ser un factor importante de crecimiento y/o diferenciación durante el desarrollo normal de un feto.

El teratocarcinoma está formado de células de carcinoma de embrión indiferenciadas (EC) y varios tejidos somáticos entremezclados. Las líneas de células de teratocarcinoma humano y de ratón producen IGF-I y el tipo I del receptor IGF. Estos tipos de tumor se originan de células germinales ectópicas por afuera de las gónadas o de inclusiones embrionarias, con las células pluripotenciales que escapan de la influencia de organizadores embrionarios.

La histopatología del teratocarcinoma murino se asemeja al teratocarcinoma humano. Ambos tejidos comprometidos son derivados de los tres estratos de la línea germinal primaria: mesodermo, endodermo y ectodermo. En adición, las células EC pueden revertir desde el fenotipo maligno y participar en el desarrollo normal.

Las células del embrión de carcinoma murino PCC3 expresan IGF-I y es receptor, a intervalos de todas las estructuras tumorales derivadas que expresan IGF-I e IGF-II y sus receptores. Con una estrategia de antisuero episomal, el equipo de investigadores dirigidos por el Dr. Jerzy Trojan, del Instituto de Patología del Centro contra el Cáncer de la Escuela de Medicina de la Universidad de la Reserva de Case Western en Cleveland Ohio, definieron el papel para IGF-I en la tumorigeneicidad y evasión de la vigilancia inmune. El antisuero de IGF-I EC transfectado fue evaluado para elucidar una respuesta inmune antitumoral con

regresión tumoral en diferentes sitios. En contraste, IGF-II fue evaluado para dirigir la determinación y diferenciación en células EC.

Las observaciones generadas por el equipo de investigadores pueden ser generalizadas asumiendo que el papel de la diferenciación de IGF-II en células EC es mediada por el receptor tipo II IGF. En la presencia de IGF-I, IGF-II es incapaz de inducir la diferenciación de tejidos y estructuras. (41)

Pacientes con células espumosas de carcinoma del cuello y cabeza (SCCHN) son afligidos con un proceso de padecimientos que frecuentemente tiene profundos efectos en el habla, en la deglución, y la digestión. La supervivencia promedio de estos pacientes ha permanecido en aproximadamente un 45% durante cerca de 30 años, desde que la cirugía y la radioterapia fueron instituidas. El tratamiento de fallas en estos pacientes permanece local y regional: sólo el 10 al 15% de los pacientes con esta enfermedad mueren debido a metástasis.

Recientes estudios se basan en la pérdida de la heterocidad del cromosoma 9p21-22 como la más frecuente alteración en SCCHN, los cuales sugieren que podrían ser un aliciente en progreso hacia este neoplasma. El gen del tumor supresor p53 ha sido sujeto de un inmenso interés e investigación en recientes años. Alteraciones en el gen p53, incluyendo la supresión, inserción y mutación puntual, son los más frecuentes eventos genéticos en diferentes carcinomas, tales como el de colon, de mama, y pulmón, así como sarcomas de tejido blando y leucemias. Diversos investigadores han demostrado la alta frecuencia de las alteraciones del gen p53 en SCCHN.

Numerosos reportes han demostrado que el crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer humano, incluidos los representativos de colon, glioblastomas, de mama, y osteosarcomas, pueden ser funcionalmente suprimidos por la transfección de ADN o la transfección mediada por retrovirus del gen nativo p53. Este gen puede tener un importante papel no únicamente en el crecimiento celular, sino en la apoptosis (muerte celular programada). La inducción de la expresión exógena del gen p53 ha demostrado inducir apoptosis en líneas de cáncer de colon y en cáncer esferoide de pulmón humano.

El equipo de investigadores dirigidos por el Dr. Liu Ta-Jen, del Departamento de Cirugía del Cuello y Cabeza, de la Universidad de Texas, en Houston Texas, demostró la supresión del crecimiento del cáncer de este tipo de extremidades, utilizando un vector adenoviral del tipo silvestre Ad5CMV-p53, que provee un atractivo sistema de liberación para investigar los efectos del gen exógeno p53 en líneas de células SCCHN tanto *in vivo* como *in vitro*. La infección por el adenovirus con p53 en las células SCCHN, indican una producción de 10 veces por arriba de los niveles ARNm de p53 con respecto a las células tratadas sin el gen. Un estudio específico muestra que los niveles incrementados de la proteína producida por el gen p53 en las células infectadas vía Ad5CMV-p53, son un reflejo de la expresión de ARNm del gen p53. Ensayos del crecimiento *in vitro* revelan que la detención del crecimiento es seguida por la infección del Ad5CMV-p53 como células con cambios morfológicos consistentes con la apoptosis. Estudios *in vivo* en ratones desnudos con carcinoma espumoso en nódulos establecido subcutáneos indican que el volumen del tumor son significativamente reducidos en los ratones tratados que recibieron infiltración peritumoral de Ad5CMV-p53. (42)

La activación de fármacos antivirales como una consecuencia de la expresión de timidina cinasa ha sido mostrada en años recientes como un potencial en el tratamiento de tumores malignos. Al igual que otros investigadores utilizan el gen de timidina cinasa del *Herpes simplex* para el tratamiento de tumores en las células de la glía, los investigadores del Departamento de Radiación Oncológica del Hospital Henry Ford, en Detroit Michigan, recurrieron a este gen para un mejoramiento selectivo por medio de un agente antiviral. (44)

La utilización del gen de timidina cinasa del *Herpes simplex* no solamente se enfoca a males localizados, sino que el equipo de investigadores de la Fundación Imperial en Investigación en Cáncer en Londres, Inglaterra, y el Departamento de Pediatría Experimental de la Universidad de Texas, en Houston Texas, dirigidos por el Dr. Richard Vile, utilizaron la expresión del tejido específico del gen del HSV-tk en una terapia génica sistémica de melanomas murinos para obtener un componente inmune. (45)

Las estrategias desarrolladas por la terapia génica pueden permitir a la medicina contemporánea incrementar el manejo de tumores sólidos malignos. Esto es afirmado por el grupo de investigadores del Departamento de Cirugía Torácica de la Universidad de Texas, en Houston Texas, guiados por el Dr. Gary Clayman, los cuales realizaron terapia molecular *in vivo* con el gen p53 del adenovirus para el tratamiento de residuos microscópicos de carcinomas espumosos en cuello y cabeza. (46)

La pared arterial es una estructura compleja multicelular, la cual es importante en la regulación de la inflamación, coagulación, y la regulación del flujo de sangre. Las células musculares vasculares lisas (SMC) son localizadas

predominantemente en la túnica media arterial y son importantes reguladoras del tono vascular y la presión vascular. Los daños arteriales resultan en la migración de SMC dentro de los estratos íntimos de la pared arterial, donde proliferan y sintetizan componentes de la matriz extracelular. Esta respuesta proliferativa neointima de SMC ha sido implicada en la patogénesis de la aterosclerosis. Además, el daño arterial después de angiopatía de balón percutánea de las arterias coronarias, resulta en la proliferación neointima de SMC y clínicamente significa la restenosis en el 30 al 50% de los pacientes. Algunos factores de crecimiento inducen a la proliferación de SMC vasculares *in vitro* y en *in vivo*. Esta redundancia en el factor de crecimiento señala, que terapias citotóxicas efectivas para desórdenes proliferativos vasculares podrían tomar como blanco de ciclos celulares nucleares de sendas regulatorias bastante más que signos proximales de transducción de moléculas. Este tipo de experimentos fue realizado en la Universidad de Chicago en Chicago Illinois, por el Departamento de Medicina Patológica, dirigidos por el Dr. M. Chang.

El producto del gen de retinoblastoma (Rb) está presente en la forma activa y fosforilada de SMC inactivas arteriales primarias, pero es rápidamente inactivada por la fosforilación en respuesta al factor de estimulación del crecimiento *in vitro*. Una replicación defectiva de un adenovirus codifica a formas no fosforilables, constitutivamente a la forma activa de Rb que fue construida. La infección de cultivos primarios de SMC de aorta de rata con este virus, inhibe la proliferación del factor estimulador de crecimiento de células *in vitro*. La infección arterial localizada con el virus en el tiempo de la angiopatía de balón, reduce significativamente la proliferación de SMC y la formación neointima en ambos modelos de restenosis animal, carótides de rata y arteria femoral porcina. (47)

5. CAPITULO CUARTO

5.1 TERAPIA GENICA PARA EL SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

Desde que la humanidad existe como tal, ha tenido una serie de padecimientos que la acompañan desde tiempos inmemoriales, iniciando por simples afecciones que causan malestares como la presencia del rinovirus en el cuerpo, hasta las infecciones generalizadas como en el caso de la peste bubónica la cual arrasaba con las poblaciones.

En tiempos más recientes se ha visto como un gran número de personas han perdido la vida como consecuencia de la aparición de una nueva infección causada por un virus (virus de inmunodeficiencia humana, VIH), que demanda cada vez más y de forma acelerada la vida del portador del mismo. Es aquí donde la terapia génica otorga un emplazamiento del tiempo de vida promedio y podría curar en un futuro la infección ocasionada por el VIH.

Uno de los mejores aciertos que han tenido últimamente las investigaciones del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha sido la identificación de una clase de moléculas que pueden específicamente interferir con la replicación del VIH-1. Se han descrito una serie de moléculas potenciales anti-VIH-1 producidas por una mutación específica para afectar adversamente la estructura o función viral. Estas moléculas son el blanco viral directo por inclusión de los genes estructurales modificados de los virus originales. Efectos terapéuticos son introducidos por una u otra de las mutaciones transdominantes de los mismos genes estructurales, o por la fusión de una enzima para el gen estructural.

Como una alternativa para los genes estructurales basados en estos acercamientos, el equipo de investigadores del Departamento de Biología del Cáncer, de la Escuela de Salud Pública de Harvard, en Boston Massachusetts, dirigidos por el Dr. Zene Matsuda, han buscado ávidamente la identificación de una proteína basada en un gen estructural que podría ser específicamente tomado como blanco para la práctica terapéutica y disminuir la infección. El equipo espera encontrar una molécula candidato, que tenga una secuencia específica de asociación viral y actividad inhibitoria. Además de estos dos requerimientos esenciales, el equipo tomó 3 criterios para la selección de la molécula apropiada: 1) La proteína debe de ser extraña para VIH-1 y no ser codificada por el genoma del VIH-1; 2) La proteína debe de ser lo bastante pequeña para facilitar futuras modificaciones y análisis; 3) La proteína no debe de tener actividad enzimática irrelevante que requiera de regulación.

Basados en estos criterios, este grupo ha probado la Vpx, una proteína accesoria no estructural asociada al virus de VIH-2 y al virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). Vpx es una pequeña proteína con una afinidad a los ácidos nucleicos, esta afinidad puede ayudar a causar un disturbio en la organización molecular del VIH-1 cuando Vpx está presente en el virus. Esta molécula de tamaño pequeño podría facilitar la producción de derivados Vpx que tienen efectos inhibitorios para el VIH-1. (48)

La proteína Tat es un potente transactivador de la expresión del gen del VIH-1, y puede tener funciones adicionales en la patogénesis del SIDA, incluyendo el efecto como factor del crecimiento celular vascular, el cual puede ser relevante para el sarcoma de Kaposi asociado al VIH. Por lo tanto, Tat es un blanco deseable para una terapia de intervención en contra de la infección del

VIH-1. El ARN de *tar* (responsable de activación de Tat) forma una estructura de "lazo de tronco" y Tat se une a esta región saliente con alta eficiencia. Esta interacción de proteínas-ARN es esencial para la activación de *Tat* en la región de repetición larga terminal (LTR) del VIH-1. El grupo de investigadores del Laboratorio de Biología Celular de Tumores, del Instituto Nacional del Cáncer, de los Institutos Nacionales de Salud, en Bethesda Maryland, guiados por la Dra. Juliana Lisziewicz, demostraron que un ARN corto de *tar* polimérico puede inhibir la transactivación mediada por *Tat* de la LTR de VIH-1 en ensayos de transfección pasajeros. El ARN atrayente, compatible con los elementos de la respuesta de la activación polimérica de *Tat* (TAR), se favorece la competencia por la unión de Tat en un equilibrio con el ARN del TAR viral, con lo cual se inhibe la replicación viral. (49)

La replicación del VIH requiere interacciones entremezcladas con el genoma viral, proteínas regulatorias sintetizadas por el virus, y factores celulares. De este modo, Rev es una proteína viral esencial traducida desde un ARNm viral altamente unido, sintetizado tempranamente en la infección del virus. Esta proteína nuclear de 19 kDa actúa en concierto con factores celulares del hospedero para facilitar la exportación de ARNm viral no procesado dentro del citoplasma, por lo que se piensa que sea importante en la regulación de la latencia del virus. Mutaciones en la secuencia codificadora reducen enormemente la replicación viral y la formación de partículas. Análisis mutacionales adicionales de esta proteína han sido identificadas como un dominio conservado altamente rico en leucina que es requerida para la función Rev, presumiblemente por interacción con factores del hospedero. Mutaciones en esta región tienden a elevar a la proteína defectiva que actúa como un inhibidor transdominante, el cual

inhibe la replicación del VIH en células T de leucemia y no afectan funciones normales diversas de células T.

El conjunto de investigadores del Instituto Médico Howard Hughes, del Centro Médico de la Universidad de Michigan, dirigidos por el Dr. Clive Woffendin, han evaluado la eficacia de Rev en células CD4(+) de sangre periférica de humanos. Estas células fueron genéticamente modificadas por el uso de vectores retrovirales o por transfección de genes mediada por partículas. El grupo encontró que ambos métodos permitían la liberación de Rev, lo cual podría proveer protección en contra de cambios en las clonas y las separaciones primarias de VIH. Estos hallazgos facilitarán los esfuerzos para desarrollar tratamientos antivirales clínicamente relevantes de transfección de genes. (50)

Las inmunizaciones intracelulares como una forma de terapia génica han sido usadas para inhibir infecciones de VIH-1 en el nivel celular, incluidos los acercamientos tales como ARN antisentido, ribozimas, y mutantes dominantes negativos. Los anticuerpos expresados intracelularmente, refiriéndose como "intracuerpos", son una nueva clase de moléculas terapéuticas para la terapia génica. Los intracuerpos pueden ser diseñados para unir e inactivar moléculas blanco dentro de las células. Los investigadores de la División de Retrovirología del Instituto para el Cáncer Dana-Farber, dirigidos por el Dr. Wayne Marasco, demostraron que células de mama pueden ser transducidas establemente para producir anticuerpos intracelulares anti-VIH-1, en donde las células son resistentes a los efectos citopáticos de la infección del VIH-1.

Un intracuerpo de cadena simple (anti-gp120), denominado sFv105 reconoce el sitio de unión CD4(+) del VIH-1 de la cubierta de glicoproteínas,

donde es expresado constitutivamente bajo el control del promotor del CMVIE. Los intracuerpos son expresados establemente y retenidos en el retículo endoplásmico, donde no causa efectos tóxicos a las células.

Asimismo, un vector de expresión inducible fue construido en donde el intracuerpo sFv105 estaba bajo el control del promotor LTR del VIH-1. El intracuerpo fue expresado después de la infección del VIH-1 o en la presencia de la proteína Tat, la cual es retenida intracelularmente

Recientes estudios demostraron que los órganos linfoides humanos son los mejores sitios de infección del VIH-1. En una aplicación de la terapia génica la transducción de sFv105 produce linfocitos que pueden repoblar *in vivo*, áreas dependientes de células T en tejidos linfoides. (51)

Los padecimientos del citomegalovirus humano (HCMV) son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con SIDA. La manifestación más común de las enfermedades del HCMV en estos pacientes es la retinitis, pero el involucramiento gastrointestinal es reportado en 2.2 a 13.1% de pacientes con SIDA, en donde las enfermedades diseminadas son encontradas en las autopsias en arriba del 90% de los pacientes. Ya que la eficacia de la terapia antiviral es influenciada por la temprana administración, métodos rápidos y específicos pueden ser desarrollados para un diagnóstico temprano. Estudios recientes han demostrado la alta sensibilidad de hibridación *in situ* para el HCMV con biopsias gastrointestinales, pero el método es técnicamente complejo y no puede ser adaptado para un análisis rutinario. La detección de ADN de HCMV en la sangre y orina por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido previamente reportada en pacientes con SIDA o inmunosuprimidos. Por lo que el grupo de

investigadores de la Unidad de Investigación Clínica en SIDA y Hepatogastroenterología, del Hospital Hôtel-Dieu y el Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale en Lyon Francia, dirigidos por el Dr. L. Cotte, han evaluado el valor del diagnóstico de la amplificación de ADN del HCMV por PCR de biopsias obtenidas de una población de pacientes infectados por VIH con y sin padecimientos gastrointestinales.

Los ensayos demostraron que los pacientes no infectados con el VIH, y además sin los padecimientos del HCMV, dan la prueba por PCR negativa. Ahora bien, para pacientes infectados con VIH y además con padecimientos gastrointestinales (la infección del HCMV se representa a nivel del duodeno o con colitis) del HCMV, la prueba por PCR es positiva en un 100% de los pacientes.

La amplificación del ADN del HCMV de biopsias gastrointestinales es una herramienta sensitiva y específica para el diagnóstico de padecimientos gastrointestinales causados por el HCMV en pacientes con SIDA. (52)

El sarcoma de Kaposi (KS) es un padecimiento angioproliferativo que en años recientes, ha tenido un comportamiento epidémico en asociación con la infección del VIH. Rasgos característicos histológicos del KS incluyen la proliferación de células fusiformes de orígenes vasculares considerados a ser tumores, y de células endoteliales normales formadoras de vesículas (angiogénesis), infiltración de células inflamatorias, y edema. Observaciones previas sugieren que, en últimas apreciaciones, el KS no es realmente un tumor, sino un padecimiento hiperplástico/proliferativo mediado por citosinas, con factores angiogénicos los cuales juegan un papel importante en este desarrollo. Por ejemplo, sobrenadantes de células fusiformes derivadas de lesiones de KS de

pacientes con SIDA, presentan propiedades angiogénicas: específicamente inducen a células endoteliales normales a migrar, degradar, y cruzar la membrana basal (invasión), y a proliferar; los eventos requeridos para la angiogénesis.

Diversas observaciones sugieren que, citosinas producidas por células derivadas de lesiones de KS en pacientes con SIDA (SIDA-KS), como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), representan un factor angiogénico bien caracterizado, el cual resulta el mayor contribuidor al desarrollo de lesiones ocasionadas por KS. En pruebas realizadas *in vitro*, células SIDA-KS derivadas de varios pacientes, expresan altos niveles de ARNm de bFGF, y contienen abundantes cantidades de proteínas de bFGF fusiformes (18, 23, y 25 kDa) en su núcleo y citoplasma. La forma activa biológicamente en la media extracelular de bFGF, induce el crecimiento de las mismas células SIDA-KS y células del endotelio normal. bFGF es también una citocina expresada *in vivo* en células fusiformes de lesiones ocasionadas por el KS en humanos y detectada en ARNm y niveles de proteínas.

Para determinar el papel de bFGF en el desarrollo del KS y para evaluar el potencial de candidatos a fármacos en una terapia para el KS, el grupo de investigadores del Laboratorio de Biología Celular de Tumores, del Instituto Nacional contra el Cáncer, de los Institutos Nacionales de Salud, en Bethesda Maryland, dirigidos por la Dra. Bárbara Ensoli, probaron el oligonucleótido antisentido fosforilado modificado (AS), complementario para el ARNm de bFGF, y así bloquear el crecimiento de células SIDA-KS *in vitro* en el modelo del ratón atímico con KS.

Los resultados demostraron que los oligómeros ASbFGF bloquean el crecimiento de células SIDA-KS *in vitro* e inhiben la formación angiogénica del KS, así como lesiones inducidas por inoculación de células SIDA-KS en el ratón desnudo. Estos efectos son obtenidos en concentraciones no tóxicas, y son complementarios para la inhibición de la producción de bFGF, la cual es requerida por células SIDA-KS para entrar al ciclo celular y promover el crecimiento celular endotelial y la posterior invasión. (53)

El VIH causa una infección crónica en humanos que es caracterizada por una gradual disminución de células CD4(+). Estudios detallados inmunológicos y virológicos han mostrado que el SIDA es la fase final del proceso de la enfermedad, que es continuamente activa desde el momento de la infección. La marca más extensivamente usada para mostrar una infección asintomática del VIH-1 es el conteo de células CD4(+). Sin embargo, personas con conteos similares de células CD4(+) pueden presentar un comportamiento diferentes para su velocidad de disminución de células CD4(+), lo que resulta riesgoso para la progresión clínica, limitando la utilidad de los conteos de células CD4(+) como un criterio único para la intervención terapéutica durante el período asintomático. Por esta razón, el desarrollo de marcadores adicionales predictivos para una rápida declinación de células CD4(+) y la progresión de la enfermedad es de una mayor importancia clínica.

Previamente, el grupo de investigadores del Servicio de Transfusión de Sangre la Cruz Roja en Holanda, y la Universidad de Amsterdam en Holanda, dirigidos por el Dr. Maarten Koot, describieron las diferencias en propiedades biológicas entremezcladas de los aislamientos de VIH-1, tales como la capacidad de inducir sincicios (SI), el valor de la replicación, y el citotropismo. Estas

diferencias fenotípicas fueron independientes de la cantidad de virus y pueden ser reproducidas en los niveles de clonas moleculares y biológicas. Considerando que los aislamientos que no inducen sincicios (NSI) pueden ser detectados a través de la infección, los aislamientos SI generalmente se desarrollan únicamente en el curso de la infección del VIH-1 y tiende a preceder el desarrollo del SIDA en el 50 al 60% de pacientes.

De este modo, el grupo de investigadores mencionado, verificó que el fenotipo biológico del VIH-1 es un práctico marcador binario para la progresión del SIDA, el cual es independiente del conteo de células CD4(+) y antigenemia. La aparición de variantes SI, ocurre 2 años antes de la progresión hacia el SIDA en el promedio, en donde es predictivo para un valor significativamente incrementado de células CD4(+) en declive. (54)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6. CAPITULO QUINTO

6.1 TERAPIA GENICA PARA EL TRATAMIENTO DE DIVERSAS DEFICIENCIAS

La deficiencia en la producción de proteínas esenciales para el desarrollo normal del organismo, es una de las tareas a las cuales la terapia génica interviene de forma exitosa; modifica los patrones de desarrollo de diversas proteínas al cambiar la secuencia en el comportamiento de un tipo determinado de células, modificando de forma radical la funcionalidad de determinadas regiones del cuerpo humano, o de algún tipo de tejido en especial. Es así como se logran alcanzar objetivos planteados por otro tipo de tratamientos, en los cuales no se lograba la completa satisfacción tanto por parte del paciente, como por el responsable del tratamiento.

La terapia génica se va haciendo presente en más padecimientos tanto infecciosos como hereditarios; sin lugar a dudas, los tiempos en que la genética aplicada sea una rutina en clínicas y hospitales no son muy lejanos, ya que con el desarrollo creciente de la tecnología aplicada para tales fines, los procesos de transfección de genes serán rutinarios.

La marcada importancia de la terapia en la ayuda de este tipo de enfermedades, se realizó desde los mismos inicios en que la terapia génica se propuso como tal, ya que el primer protocolo para la aplicación de la misma, se realizó de forma exitosa en una enfermedad en la que se involucraba una inmunodeficiencia: la deficiencia de adenosina desaminasa cuyo tratamiento se aprobó en el año de 1990 por el Comité de ADN Recombinante, de los Estados Unidos.

La terapia génica no se puede enfocar solamente a aquellos males que son generalizados, y los cuales, son en la época presente, un sello característico. La terapia se puede aplicar a todo tipo de procesos infecciosos y padecimientos relacionados con alguna deficiencia.

Una deficiencia heredada de β -glucuronidasa en humanos, (ratones y perros) causa mucopolisacaridosis VII (síndrome de Sly); una enfermedad progresiva y degenerativa que reduce el tiempo máximo de vida (en un promedio de 4 a 5 meses en ratones) y resulta de un depósito lisosomal de glicosaminoglicanos no degradados, en el bazo, hígado, riñón, córnea, cerebro, y sistema esquelético. El trasplante de médula ósea en ratones mutantes, provee una fuente de enzimas normales, la cual mejora la condición clínica y extiende el promedio de vida máximo a 18 meses. La terapia génica por transfección de genes β -glucuronidasa dentro de células hematopoyéticas mutantes, representa un acercamiento alternativo, aunque no son conocidas sus funciones todavía, dada la baja expresión de los genes transfectados por un vector *in vivo*. Ahora bien, el grupo de investigadores del Laboratorio Jackson, de Bar Harbor, en Maine, conjuntamente con la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Philadelphia, en Pennsylvania, guiados por el Dr. John Wolfe, corrigieron parcialmente la deficiencia, por reducción del almacenamiento lisosomal en hígado y bazo.

Células de médula ósea de mucopolisacaridosis (MPS) VII de ratones fueron infectadas con el vector retroviral NTK-BGEO, y se encontró que los bazos de varios animales examinados, mostraron análisis positivos de células productoras de β -glucuronidasa después de 11 días de la transfección. (55)

La distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD y BMD) es un padecimiento recesivo ligado al cromosoma X causado por una expresión defectuosa de distrofina. El ratón mdx, un modelo animal para DMD, tiene una mutación que elimina la expresión de 427K de isoformas de distrofina de músculos y cerebro. No obstante estos animales no despliegan la debilidad del músculo abierto o el movimiento deteriorado, el músculo del diafragma del ratón mdx es severamente afectado y muestra una degeneración de miofibras progresiva y causa fibrosis, con la que se asemeja a la deficiencia humana. El Departamento de Genética Humana, del Instituto de Gerontología, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Michigan, en Ann Arbor, Michigan, dirigidos por el Dr. Gregory Cox, exploraron la factibilidad de la terapia génica en DMD, en donde examinaron el potencial de un transgen de distrofina para corregir los síntomas distróficos en ratones mdx. El grupo encontró que la expresión de distrofina en músculos de ratones transgénicos mdx, eliminó los síntomas morfológicos e inmunohistológicos de la distrofia muscular. Además la sobreexpresión de distrofina previno el desarrollo de las propiedades mecánicas anormales asociadas con el músculo distrófico sin los efectos que causan la supresión. (56)

La deficiencia de piruvato cinasa (PK), el desorden más común de eritroenzimopatía glicolítica, responsable de hemólisis crónica, es heredada de un rasgo recesivo autosomal y fue reportada por primera vez en el año de 1961. En la deficiencia de PK, en adición a la esplenomegalia y hepatomegalia ocasional, los síntomas clínicos son altamente variables, pasando desde una predisposición neonatal pronunciada, la cual requiere transfusiones combinadas múltiples para una anemia hemolítica compensada plenamente. Los síntomas clínicos son observados tanto en homocigotos verdaderos, como en heterocigotos

compuestos. El paciente asintomático sufre desde una anemia, predisposición crónica, esplenomegalia, y cálculos biliares. Además, la deficiencia de PK puede en algunas veces ser fatal en la infancia temprana. No obstante la esplenectomía es efectiva en la mayoría de los pacientes, algunos sufren de una persistente anemia hemolítica, resultando en cálculos biliares o hemocromatosis lisa después de la esplenectomía.

Los tratamientos para los padecimientos humanos por transfección de genes han progresado recientemente desde la especulación hasta la realidad. Las enfermedades tomadas como mejores blancos para la terapia génica, en células somáticas, son consideradas actualmente para el tratamiento de desórdenes causados por defectos de genes monocistronicos. Muchos investigadores consideran a las células hematopoyéticas estaminales como una de las mejores células blanco para la terapia génica, debido a su fácil manejo, así como a, su capacidad de replicación. Sin embargo, estudios recientes muestran las dificultades de obtener expresiones largas y terminales de genes introducidos en células de médula ósea, particularmente de animales criados debido a que células estaminales pluripotenciales cosechadas, son de la fase inactiva y, son de este modo, resistentes a infecciones retrovirales.

Para estudiar la factibilidad de la terapia génica en la deficiencia de PK, el conjunto de investigadores del Departamento de Hematología/Oncología, del Instituto de Ciencias Médicas, de la Universidad de Tokio, guiados por el Dr. Kenzaburo Tani, construyeron un retrovirus PK usando ADNc de hígado tipo PK de humano (LPK) para poder realizar una mejor transfección. La expresión de la actividad enzimática LPK humana fue analizada en las células retrovirales

transducidas. Un análisis posterior demostró la expresión de ARNm de LPK humano en cada línea celular. (57)

La hipercolesterolemia familiar se ha presentado como un modelo para el desarrollo de la terapia génica directa en el hígado. Este padecimiento, el cual es causado por una deficiencia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LPL), es asociado con una severa hipercolesterolemia y padecimientos arteriales coronarios. Los homocigóticos de una hipercolesterolemia familiar son refractorios a las formas más prácticas de terapia, excepto para la transplatación de hígado ortotrópica, la cual ha llevado a la corrección completa de la dislipidemia. El éxito del trasplante de hígado, sugiere que la reconstitución selectiva de receptores LDL hepáticos por transfección de genes somática, puede ser suficiente para la corrección metabólica.

La disponibilidad de un auténtico modelo animal para la hipercolesterolemia familiar, llamada conejo hiperlipidémico heredable de Watanabe, ha facilitado enormemente el desarrollo de terapias génicas directas de hígado.

Una ventaja de los hepatocitos como un blanco para la transferencia de genes *in vivo* es que la microcirculación del revestimiento del endotelio del hígado es fenestrado, permitiendo el acceso de virus recombinantes administrados parenteralmente. Acercamientos no virales tales como liposomas y conjugados mediados por ligandos, pueden transfectar hepatocitos *in vivo* sin el estímulo regenerativo como una hepatectomía parcial; sin embargo, la expresión de genes recombinantes es baja y pasajera.

El grupo de investigadores del Instituto de Terapia Génica, y los Departamentos de Ingeniería Celular y Molecular, y Cirugía, de la Universidad de Pennsylvania, dirigidos por la Dra. Karen Korzarsky, describieron los efectos de diferentes promotores en la expresión transgénica, y además, la producción de un adenovirus que contiene el ADNc del receptor LDL humano y el uso de éste para corregir la deficiencia genética en conejos hiperlipidémicos heredables de Watanabe. En dicho experimento, se construyó un adenovirus que expresa el receptor LDL, usando el promotor más activo, el cual fue vaciado dentro de la vena portal de los conejos deficientes. Análisis de los tejidos del hígado cosechados después de la infusión de los virus, mostraron proteínas del receptor LDL humano en la mayoría de los hepatocitos. (58)

La hemofilia A es un desorden genético recesivo ligado al cromosoma X, resultado de una deficiencia del factor VIII (FVIII), lo cual, de forma severa, representa una vida amena de padecimientos hemorrágicos.

Las infusiones del FVIII purificado es actualmente la terapia más usada en este tratamiento. Recientemente, procedimientos de manufactura improvisados, y la producción de FVIII recombinante han reducido la amenaza de complicaciones iatrogénicas. Una terapia alternativa que obvia la necesidad para infusiones regulares intravenosas puede constituir un mejor avance clínico y económico. Un estudio en Suecia con infusiones regulares de FVIII por periodos largos, comenzaron tempranamente a mantener los niveles de plasma de 2 a 4 ng/ml; este nivel estable redujo los números de episodios traumáticos y mejoró significativamente la condición inicial de los pacientes. Estos estudios sugieren que la liberación continua de FVIII vía terapia génica podría proveer un significativo beneficio terapéutico.

Los retrovirus son únicamente en su género adecuados como vectores para la transfección de genes. La integración de la maquinaria viral es muy eficiente, resultando en un estable provirus con estructura predecible, y puede infectar un amplio espectro de tipos de células.

La Corporación Terapia Somática, en Alameda California, al verificar que en otros experimentos se lleva a cabo un pobre desarrollo en la producción del FVIII, decidieron por medio del Dr. Varavani Dwarki, realizar una liberación de genes mediada por un retrovirus de un dominio-B suprimido del FVIII humano, con el uso de un sistema de vectores, el cual permitió una transducción eficiente de la mayoría de las células en cultivo, pudiéndose realizar análisis posteriores en los cuales se registraban niveles altos de FVIII. Además, los investigadores transplantaron fibroblastos primarios dentro de animales de laboratorio, en donde los niveles terapéuticos de FVIII en circulación, se obtuvieron por más de una semana. La capacidad de células primarias para liberar el FVIII dentro de la circulación fue fuertemente dependiente del sitio de implantación. (59)

La inmunodeficiencia severa secundaria combinada para un defecto genético en la enzima catabólica de purina adenosina desaminasa [ADA-SCID], se caracteriza por una función defectiva de células B y T e infecciones recurrentes, frecuentemente involucrando patógenos oportunistas. Grandes cantidades de desoxiadenosina, el sustrato de ADA están presentes en estos pacientes; la desoxiadenosina es preferentemente convertida al compuesto tóxico desoxiadenosina trifosfato en células T, incapacitando al sistema inmune. Debido a que este padecimiento es curable por transplantación alogénica de médula ósea, se ha pensado que la terapia génica puede ser directamente administrada a través de células hematopoyéticas estaminales. Sin embargo, acercamientos

iniciales para el uso de la transfección de genes estaminales en primates resulta únicamente en niveles bajos, expresión de genes pasajeros y es insuficiente para su uso clínico.

La introducción de enzimas de reemplazo con eritrocitos que contengan ADA o con conjugado ADA bovino con polietilenglicol (PEG-ADA), ha hecho este acercamiento factible. Pacientes con este tratamiento han experimentado la ganancia de peso y han presentado disminución en la aparición de infecciones oportunistas. La función de células T es medida por la respuesta mitogénica *in vitro* mejorada en la mayoría de los pacientes, e inclusive, algunos pacientes recobran respuestas inmunes consistentes para antígenos específicos. Casi todos los pacientes tratados con PEG-ADA muestran incremento en el conteo de células T periféricas, lo cual provee una fuente de células T para la corrección de genes.

El ADN complementario de adenosina desaminasa (ADNc) es de 1.5 Kb y se accesa con el vector retroviral. Con el uso de un vector retroviral conteniendo ADA, líneas de células T deficientes de ADA fueron transducidas por el grupo de investigadores del Centro Nacional para la Investigación del Genoma Humano, de los Institutos Nacionales de Salud, en Bethesda Maryland, dirigidos por el Dr. Michael Blaese, para expresar cantidades normales de ADA. Estudios posteriores en ratones, conejos, y primates usando células T modificadas con vectores retrovirales mostraron la sobrevivencia de células normales y su función después de su reintroducción dentro de los receptores animales. (60)

La inmunodeficiencia severa combinada, asociada con la deficiencia heredada de ADA, es usualmente fatal en niños afectados, los cuales son puestos en aislamiento protectorio o el sistema inmune es reconstituido por transplatación

de la médula ósea de un antígeno de leucocitos humanos idénticos de un hermano donador. Esta es una terapia de elección, que es efectiva únicamente para una minoría de pacientes. En años recientes, otras formas de terapia se han desarrollado, incluyendo los trasplantes de donadores haploidénticos, reemplazo de enzimas exógenas, y terapia génica de células somáticas.

En el Instituto Científico H. S. Raffaele, en Milán Italia, transfectaron *ex vivo* un minigen de ADA humano, siendo usados dos diferentes vectores retrovirales. Estos protocolos fueron guiados por el Dr. Claudio Bordignon, en los cuales la transfección se llevó a cabo en células de médula ósea y linfocitos de sangre periférica de 2 pacientes bajo la terapia de reemplazo de enzimas. Después de 2 años de tratamiento linfocitos de B y T sobrevivieron por largo tiempo y células de la médula, y granulocitos expresaron el gen transfectado de ADA, el cual demostró y resultó en la normalización del repertorio inmune e inmunidad celular y humoral. Después de que el tratamiento fue discontinuado, linfocitos T derivados de linfocitos de la sangre periférica transducidos, fueron progresivamente reemplazados por células T derivadas de médula en ambos pacientes. (61)

7. CAPITULO SEXTO

7.1 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

VECTORES.

1. La singularidad de utilizar un vector que llene las necesidades de trabajo de diversos científicos para la transfección de genes, ha considerado a los virus como el modelo a seguir. De aquí, que los virus se mantengan como una base en la ayuda de este tipo de tratamientos ya que a cada momento se perfeccionan las técnicas de purificación para este tipo de vectores con lo que se obtendrá una mayor especificidad en el tratamiento de diversos males.
2. En la búsqueda de vectores en los que se conjunten eficiencia e inocuidad, aparecen los liposomas como una realidad, en la cual se realizarán un gran número de tratamientos.
3. La introducción de genes "suicidas" por medio de vectores retrovirales, es una de las vías *in vivo* en las cuales se alcanzan mejores resultados, en el tratamiento de células tumorales, logrando así una respuesta inmunológicamente mediada por virus, para la función posterior de susceptibilidad a ciertos fármacos.

CANCER.

1. Es igualmente efectiva la introducción *in vivo* de los genes de citosinas (IFN- α/γ IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF y el G-CSF) por medio de un vector viral, que la aplicación de las mismas directamente en el lugar tumoral.

2. El sistema inmune puede ser reactivado por las mismas células cancerosas gracias a la clonación de anticuerpos monoclonales, actuando conjuntamente con el TCR por la extracción de un heterodímero de éste, por lo que la técnica se puede llevar a un nivel *in vivo* y por vía sistémica.
3. El tratamiento de diferentes representaciones de células tumorales toma una alternativa diferente; se transfecta las células cancerosas *in vivo* con un virus el cual expresa el gen p53, logrando así la apoptosis y la posterior disminución del tumor.

SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA.

1. Una de las terapias más efectivas en contra del virus se basan en el empleo de cepas con mutaciones de proteínas específicas, como Vpx, la cual actúa a un nivel específicamente estructural. Conceptualizando al síndrome como una entidad energética, mutaciones a proteínas transactivadoras de la expresión viral son igualmente afectadas, como la proteína Tar. Siendo de la misma manera afectados la forma y función viral, la proteína Rev es parcialmente transformada a través de un retrovirus en proteínas defectivas de la replicación en células T del virus.
2. Los intracuerpos son producidos por células de mama transducidas por un vector de expresión inducible (CMV), los cuales son resistentes a efectos citopáticos por parte del VIH-1, en donde reconocen el sitio de unión de glicoproteínas de células CD4(+). Los intracuerpos se expresan conjuntamente con la proteína Tat actuando en contra del virus, resultando en un mejor efecto

en los órganos infectados favoreciendo el repoblamiento *in vivo* por parte de los linfocitos.

- 3 La detección oportuna de ADN del HCMV en la sangre y orina de pacientes con SIDA por PCR, prolonga más el tiempo de vida de un paciente infectado, ya que un alto porcentaje de la mortalidad de las personas infectadas es debido a los padecimientos de HCMV.

DIVERSAS DEFICIENCIAS.

1. Con experimentos realizados *in vivo*, el síndrome de Sly es erradicado gracias a un aumento en el registro en la producción de células β -glucuronidasa positivamente, gracias a la transfección de genes de β -glucuronidasa dentro de células hematopoyéticas mutantes por medio de un vector retroviral.
2. La terapia génica al corregir los síntomas distróficos de DMD en ratones mdx, se logra por la expresión de distrofina en los ratones en donde se ha realizado la transfección corrigiendo los síntomas morfológicos e inmunohistológicos de la distrofia muscular.
3. En la corrección de la deficiencia de PK se transfectaron células hematopoyéticas estaminales, gracias a un retrovirus construido en base a ADNc de hígado tipo PK de humano, en donde se alcanza una transfección más eficiente, para posteriormente analizar la expresión de ARNm de LPK humano en las líneas celulares desarrolladas.

4. Los tratamientos para la hipercolesterolemia familiar hasta el momento no son del todo efectivos. La inclusión de la terapia génica para la corrección de la deficiencia de receptores de LDL demuestran ser efectivos en modelos experimentales. Con la ayuda de vectores virales se ha logrado observar los efectos de la expresión transgénica, la cual expresa el receptor LDL en la vena portal del hígado en un modelo *in vivo*. Análisis posteriores del hígado muestran proteínas del receptor LDL humano en la mayoría de los hepatocitos.

5. La necesidad de lograr una transfección eficiente para incrementar los niveles del factor VIII en la hemofilia A, se logra gracias a un nuevo vector viral de un dominio-B suprimido del FVIII, lográndose una transducción eficiente de la mayoría de las células en cultivo y posteriormente registrando altos niveles del FVIII en circulación.

6. En el padecimiento de ADA la terapia génica interviene en la transducción de células T por medio de un vector retroviral en donde se expresan cantidades normales de ADA. Además de la transducción de células T, también se logra la transfección de células de médula ósea por medio de un vector retroviral el cual contenía un minigen de ADA humano. Después de 2 años de terapia de reemplazo de enzimas y aislamiento protector, se ha verificado la producción de células B y T en sangre periférica.

PERSPECTIVAS.

1. Para lograr el desarrollo de la terapia génica en el país, se debe de realizar de manera conjunta apoyada por distintos sectores enfocados a las ciencias de la salud, como se ha hecho en otras partes del mundo, principalmente en Europa y Japón, en donde se inicia con una propuesta del sector privado (principalmente la industria farmacéutica) y se complementa el apoyo con la aportación del Gobierno, de donde se tendría que definir el área de aplicación para su posterior desarrollo. Esto solamente se puede realizar con la perfecta definición de la infraestructura económica del país, ya que es necesario realizar inversiones basadas en el desempeño científico y tecnológico, para que un futuro se cosechen los frutos sembrados en la actualidad.

2. Con el establecimiento de la terapia génica como una opción a diversos tratamientos, se reafirma la utilidad de la misma en el sector salud, ya que representa un avance en el plano científico-tecnológico el cual repercutiría en divisas generadas en el país, por el concepto de desarrollo en el ámbito de investigación, en donde se tendría que generar el total apoyo por parte de los sectores involucrados, ya que representa a largo plazo una inversión realmente concreta. Al no tener el desarrollo de tal tecnología es necesaria la importación de materiales y equipos, lo que significa un deterioro económico importante a nivel nacional; representa a largo plazo una inversión más segura que la constante adquisición de equipos y materiales en un plano más inmediato.

GLOSARIO

- ADA: Adenosina desaminasa.
- ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.
- CF: Fibrosis quística.
- CFTR: Factor regulador transmembranal de fibrosis quística.
- CMV: Citomegalovirus.
- CTL: Linfocitos T citotóxicos.
- DAG: Distrofina asociada a glicoproteínas.
- DMD, DMB: Distrofia muscular de Duchenne y Becker.
- EC: Células de carcinoma de embrión indiferenciadas.
- EMCV: Virus de la encefalomiocarditis.
- FCR: Receptor de la fracción cristalizante.
- FDA: *Food and Drug Administration*.
- FH: Hipercolesterolemia familiar.
- FLC: Células de leucemia amigable.
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- HCMV: Citomegalovirus humano.
- HIV: Virus de inmunodeficiencia humana.
- HLA-B7: Antígeno de leucocito humano-B7.
- HLA: Antígeno de leucocito humano.
- HSV-tk: Timidina cinasa del *Herpes simplex*.
- IFN- γ , α : Interferón γ , α .
- IGF-I y II: Factor de crecimiento de insulina I y II.
- IL-2, 4, 5, 10, 12: Interleucina-2, 4, 5, 10 y 12.
- IRES: Sitio interno de entrada de ribosomas.
- KS: Sarcoma de Kaposi.

- LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
- LPL: Receptores de lipoproteínas de baja densidad.
- LTR: Repetición larga y terminal.
- mAb: Anticuerpos monoclonales.
- MHC I y II: *Complejo principal de histocompatibilidad clase I y II.*
- MPS: Mucopolisacaridosis.
- MRC: Comité Investigador Médico.
- NIAID: Instituto Nacional de Alergias y Padecimientos Infecciosos.
- NIH: Institutos Nacionales de Salud.
- NK. Células asesinas.
- NKCSF: Factor estimulante de células naturales asesinas.
- NSI: No inducción de sincicios.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PEG: Polietilenglicol.
- PK: Piruvato cinasa.
- RAC: Comité Asesor de ADN Recombinante.
- Rb: Retinoblastoma.
- SCCHN: Células espumosas de carcinoma del cuello y cabeza.
- SCID: *Inmunodeficiencia severa combinada.*
- SI: Inducción de sincicios.
- SMC: Células vasculares lisas.
- SPIRAT: Programa Estratégico para la Investigación del Tratamiento del SIDA.
- β_2 -AR: Receptor β_2 -adrenérgico.
- TCR: Receptor de células T.
- TIL: Linfocito Infiltrador de tumores.
- TNF: Factor necrosante de tumores.
- VDEPT: Terapia productora de enzimas dirigida por virus.

BIBLIOGRAFIA

1. Kelley W. N. 1994. The impact of gene therapy on medicine and society. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716:12 - 19.
2. Weissman S. M. 1992. Gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11111 - 11112.
3. Rosenberg S. A. 1992. Gene therapy for cancer. *J. A. M. A.* 268:2416 - 2419.
4. Harris J. 1993. Gene delivery and therapy strategies. *The Lancet.* 342:234.
5. Chi-Lum B,i. 1994. Surgeous try immune therapy for breast cancer. *J. A. M. A.* 272:1485.
6. Davies K. 1993. Fast forward for gene therapy. *Nature.* 361:5.
7. Butler D. 1994. France boosts gene therapy centres. *Nature* 371:550.
8. Swinbanks D. 1994. Gene therapy gets double dose of screening. *Nature.* 367:399.
9. Swinbanks D. 1994. Japan sets up gene therapy panel. *Nature.* 367:502.
10. Swinbanks D. 1994. Japan edges cautiously towards gene therapy. *Nature.* 370:243.
11. Swinbanks D. 1994. Japan turns to US for help in launching gene therapy. *Nature.* 371:464.
12. Butler D. 1994. Rhône-Poulenc to focus biotech work on gene therapy. *Nature.* 369:92.
13. Butler D. 1994. Gene therapy network sets industrial mould. *Nature.* 372:210.
14. O'Brien C. 1994. Networking gene therapy. *Science.* 266:1151.
15. Dickson D. 1993. Britain plans broad strategy on genome, approves therapy. *Nature.* 361:387.
16. Dickson D. 1993. British research council jumps at gene therapy. *Nature.* 364:8.

17. Dickson D. 1993. UK blood centres could play major role in gene therapy. *Nature*. 361:486.
18. Dickson D. 1993. Research council takes stake in start-up. *Nature*. 361:572.
19. Dickson D. 1993. UK scientist test liposome gene therapy technique. *Nature*. 365:4.
20. Unterhuber R. 1993. Gene therapy gathers in Germany. *Nature*. 365:197.
21. Skolnick A. A. & Manack L. 1993. Science reporters hear wide range of recent data at 12th annual conference. *J. A. M. A.* 270:2413 - 2419.
22. Randall T. 1993. First gene therapy for inherited hypercholesterolemia a partial success. *J. A. M. A.* 269:837 - 838.
23. Seachrist L. 1994. Gene transfer to spark a failing heart. *Science*. 264:507 - 508.
24. Goldsmith M. F. 1992. Tomorrow's gene therapy suggest plentiful, patent cardiac vessels. *J. A. M. A.* 268:3285 - 3286.
25. Wilson J. M. 1993. Vehicles for gene therapy. *Nature*. 365:691 - 692.
26. Randall T. 1993. Gene therapy for brain tumors in trials, correction of inherited disorders a hope. *J. A. M. A.* 269:2181 - 2182.
27. Skolnick A. A. 1993. Novel therapies dominate american cancer society's 35th annual science writers seminar. *J. A. M. A.* 269:2182 - 2189.
28. Goldsmith M. F. 1993. For AIDS treatment, vaccines, now think genes. *J. A. M. A.* 269:2189 - 2193.
29. Kay M. A. & Rothenberg S. 1993. *In vivo* gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*. 262:117 - 119.
30. Chamberlain J. 1993. Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 364:725 - 726.
31. Blau H. M. 1993. Muscling in on gene therapy. *Nature*. 364:673 - 675.

32. Gavaghan H. 1994. Fetal gene therapy under the microscope... *Nature*. 372:490.
33. Lehrmann S. 1994. Anti-AIDS strategy targets immune system. *Nature*. 371:192.
34. Cotton P. 1994. High-tech assault on HIV: gene therapy. *J. A. M. A.* 272:1235 - 1236.
35. Butler D. 1994. Call for risk/benefit study of gene therapy. *Nature*. 372:718.
36. Ram Z. 1993. *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Research*. 53:88 - 88.
37. Ferrantini M. 1993. α_1 -interferon gene transfer into metastatic friend leukemia cells abrogated tumorigenicity in immunocompetent mice: antitumor therapy by means of interferon-producing cells. *Cancer Research*. 53:1107 - 1112.
38. Connor J. 1993. Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J. Exp. Med.* 177:1127 - 1134.
39. Robbins P. D. 1994. Retroviral vectors for use in human gene therapy for cancer, gaucher disease, and arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716:72 - 89.
40. Primus J. F. 1994. Monoclonal antibody gene transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716:154 - 166.
41. Trojan J. 1994. Gene therapy of murine teratocarcinoma: separate functions for insulin-like growth factors I and II in immunogenicity and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:6088 - 6092.
42. Liu T. 1994. Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Research*. 54:3662 -3667.
43. Tapscott S. 1994. Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:8185 -8189.

44. Kim J. H. 1994. Selective enhancement by an antiviral agent of the radiation-induced cell killing of human glioma cells transduced with HSV-tk gene. *Cancer Research*. 54: 6053 - 6056.
45. Vile R. G. 1994. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involve an immune component. *Cancer Research*. 54:6228 - 6234.
46. Clayman G. L. 1995. *In vivo* molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Research*. 55:1 - 6.
47. Chang M. Ch. 1995. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science*. 267:518 - 522.
48. Matsuda Z. 1993. A virion-specific inhibitory molecule with therapeutic potential for human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 90:3544 - 3548.
49. Lisziewicz J. 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by regulated expression a polymeric Tat activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8000 - 8004.
50. Woffendin C. 1994. Nonviral and delivery of a human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:11581 - 11585.
51. Marasco W. 1994. Intracellular immunization to inhibit HIV-1 infection. http://hsphsun2.harvard.edu/organizations/hai/hai_ini/conferen/genethe.html#
Wayne A. Marasco. 1 - 7.

52. Cotte L. 1993. Diagnostic value of amplification of human cytomegalovirus DNA from gastrointestinal biopsies from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 31:2066 - 2069.
53. Ensoli B. 1994. Block of AIDS-Kaposi's sarcoma (KS) cell growth, angiogenesis, and lesion formation in nude mice by antisense oligonucleotide targeting basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.* 94:1736 - 1746.
54. Koot M. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4(+) cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.* 118:681 - 688.
55. Wolfe J. H. 1992. Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature.* 360:749 - 753.
56. Cox G. A. 1993. Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature.* 364:725 - 729.
57. Tani K. 1994. Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells: implications for gene therapy of human PK deficiency. *Blood.* 83:2305 - 2310.
58. Kozarsky K. F. 1994. *In vivo* correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe Heritable hyperlipidemic Rabbit with Recombinant adenoviruses. *J. Biol Chem.* 269:13695 - 13702.
59. Dwarki V. J. 1995. Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII *in vivo* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1023 - 1027.
60. Blaese M. R. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 270:475 - 479.
61. Bordignon C. 1995. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science.* 270:470 - 475.