



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

APLICACIONES CLÍNICAS DE LA TERAPIA GÉNICA EN
ENFERMEDADES CRÓNICAS.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

JORGE ALBERTO SANDOVAL ALVIRDE

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESORA: Esp. DANIELA CARMONA RUÍZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Agradezco a mi familia por ser mi soporte y apoyo cuando más lo necesite, especialmente a mis padres y abuelos que me demostraron su cariño y apoyo a lo largo de toda mi vida, así como en mi formación profesional.

A mis hermanas Adriana, Lina y Joana por ser mi motivación y mi más grande inspiración en todos los aspectos de mi vida, tanto personal como profesional.

A mis amigos, en especial a Alejandra, Lorena, Rocío y Silvia que fueron mis compañeras durante mi formación profesional y por demostrarme su amistad y apoyo incondicional.

A Benjamín por todo su apoyo emocional, Así como sus palabras de aliento durante mi formación profesional y durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Fernando por su tutoría para la realización de este trabajo, que concluye una importante etapa de mi formación como profesionista.

A la Dra. Daniela por su contribución a este trabajo realizado bajo su asesoría.

A la persona que me dio la oportunidad de tener mi primer contacto en el ámbito profesional, la Dra. Eloísa.

A mis maestros por otorgarme los conocimientos y las bases que me formaron profesionalmente y que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la UNAM y a la Facultad de Odontología que son mi casa y que me permitieron formarme como profesionista.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO	6
CAPÍTULO 1 TERAPIA GÉNICA.....	7
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Generalidades	11
1.3 Definición y tipos de terapia génica.....	18
1.3.1 En función a las células diana.....	18
1.3.1.1 Somática	19
1.3.1.2 Germinal.....	19
1.3.2 Estrategia aplicada.	19
1.3.2.1 <i>In vivo</i>	20
1.3.2.2 <i>Ex vivo</i>	20
1.3.2.3 <i>In situ</i>	21
1.4 Trasferencia genética.....	22
1.4.1 Genes integrados.....	22
1.4.2 Genes no integrados.....	23
1.5 Métodos de transferencia	24
1.5.1 Microinyección	25
1.5.2 Precipitación con fosfato de calcio.....	26
1.5.3 DEAE-Dextrano	27
1.5.4 Electroporación	28
1.5.5 Bombardeo con microproyectiles.....	29
1.5.6 Inyección de ADN directa “desnudo”	30
1.5.7 Optoporación	32
1.5.8 Lipofección.....	33
1.5.9 Hidrogeles.....	35
1.6 Vectores virales	36
1.6.1 Vectores adenovirales.....	37



1.6.2 Vectores retrovirales y lentivirales	41
1.6.3 Vectores herpesvirales.....	44
1.6.4 Vectores asociados a adenovirus	46
1.7 Terapia génica antisentido	49
CAPÍTULO 2 APLICACIONES EN ENFERMEDADES	
CRÓNICAS	52
2.1 Hemofilia.....	53
2.2 Diabetes tipo 1.....	55
2.3 Cáncer	58
2.4 VIH.....	64
2.5 Insuficiencia cardiaca	65
2.6 Distrofia muscular de Duchenne	68
2.7 Alzheimer.....	71
2.8 Artritis reumatoide	72
CAPÍTULO 3 TERAPIA GÉNICA EN ODONTOLOGÍA	74
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la medicina tratamientos para diversas enfermedades crónicas se han enfocado en la reducción de síntomas y complicaciones que éstas pueden provocar, así como intentar otorgar una mejor calidad de vida a los pacientes con dichas enfermedades.

Con el descubrimiento de los genes como unidad fundamental de la herencia y la posible modificación de los mismos a través de diferentes técnicas, nace la ingeniería genética, que tiene como finalidad la manipulación y transferencia del material genético de un organismo.

Con los avances de la biotecnología en el campo de la ingeniería genética surge la terapia génica, la cual consiste en la sustitución, integración o supresión de una región específica del material genético de un ser vivo, con la finalidad de corregir, estimular o evitar su expresión.

En la actualidad muchos ensayos clínicos para la aplicación de la terapia génica en enfermedades crónicas de diversa etiología han sido reportados en todo el mundo, algunos de estos ensayos han demostrado la fiabilidad para su realización, así como buenos resultados, mismos que sirven como primer paso para lograr su futura utilización.

La terapia génica no solo ha logrado convertirse en una atractiva alternativa de tratamiento en el campo de la medicina, sino también en la odontología con posibles aplicaciones futuras tales como lo son la reparación y estimulación de crecimiento de tejidos, vacunación contra microorganismos causantes de enfermedades bucodentales, cáncer, entre otras.



OBJETIVO

Describir a la terapia génica y sus diferentes estrategias metodológicas, así como sus aplicaciones clínicas en distintas enfermedades crónicas y en la odontología.



CAPÍTULO 1 TERAPIA GÉNICA

1.1 Antecedentes

La genética (rama de la biología que trata del estudio de la variación heredada; más específicamente, del estudio del origen, la transmisión y la expresión de la información genética) se inicia en Moravia, Checoslovaquia, con los estudios del monje Gregorio Mendel, que permitieron establecer años más tarde lo que hoy conocemos como leyes de la herencia o leyes de Mendel.

En 1882 el embriólogo Walter Fleming describe la división celular y la distribución de los cromosomas en el núcleo celular. ^{1,2}

En 1928 Griffith demuestra en neumococos que el material de una bacteria podía modificar el material de otra diferente, a lo que se denominó “principio de transformación” que relacionó con una proteína.

A partir de la postulación de la estructura del ADN y otros descubrimientos se desarrolló la tecnología con grandes expectativas en el diagnóstico y en el tratamiento de enfermedades hereditarias antes incurables. En 1969 se identifican las endonucleasas de restricción que permiten dividir el ADN en sitios específicos, actuando como un “bisturí genético” para obtener determinadas secuencias de bases, las que se pueden introducir en una bacteria (*Escherichia coli*), y al ser transferidas se combinan con el material genético de las células huésped, con la posibilidad de recombinarse y multiplicarse como una nueva estructura genética. ¹

Al conocerse la estructura molecular de las enzimas deficientes o ausentes es posible fabricarlas en el laboratorio e introducir las en el enfermo, fue en 1970 que se obtuvo el primer gen artificial y en 1971 la tecnología del ADN



recombinante que permitió la obtención de la insulina, hormona del crecimiento, interferón y vacunas con DNA humano.

En el campo clínico la fecundación *in vitro*, las modificaciones de las células germinales, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones a una matriz (FIVET: Fecundación *In Vitro* con transferencias de embriones) dio a lugar al nacimiento en 1978 de Louis Brown, el primer “bebé de probeta”.

En 1981 se consiguió el nacimiento de los primeros ratones por clonación. En 1983 se describió la reacción de la polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés), que permitió obtener y amplificar la información del ADN a través de sondas o *primers*. Esta técnica ha permitido mejorar el diagnóstico de enfermedades hereditarias antes de que se manifiesten clínicamente.

En 1986 se planteó un ambicioso programa de investigación con la participación de varios países, el Proyecto del Genoma Humano (PGH) que permitiría para el año 2005 conocer la cartografía completa del patrimonio genético del hombre, indispensable para el diagnóstico, manipulación e ingeniería genética.

En 1993 se dio a conocer la clonación de embriones humanos en el laboratorio de la Universidad de Washington. En 1995 el trasplante de corazones de cerdos genéticamente modificados a mandriles, en la Universidad de Duke. En 1997 después de 227 intentos se logró la clonación de la oveja Dolly por Jan Wilmuth en el Instituto Roslin de Escocia. En 1998 en la Universidad de Hawai informó sobre la clonación de docenas de ratones en tres generaciones. ¹

En 2003 Craig Venter dueño de la empresa encargada de desarrollar el proyecto genoma humano da a conocer el cartograma genético completo,



con lo que surge el planteamiento y la discusión de la clonación de seres humanos y clonación de órganos para transplantes.

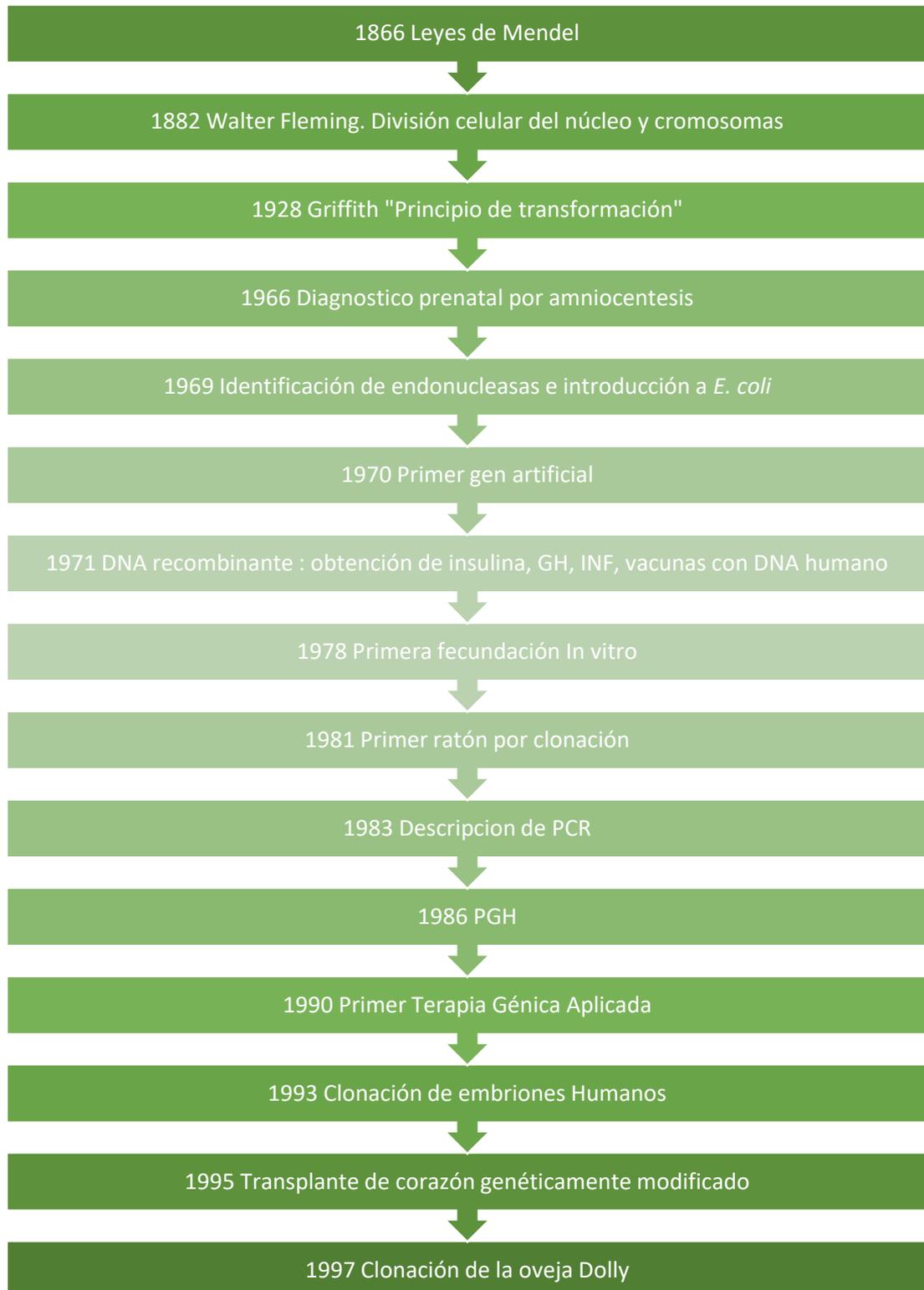
El primer caso de terapia génica fue informado en 1990, Ashanti De Silva, una niña de cuatro años portadora de inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés), con la incapacidad de producir la enzima adenosin deaminasa (ADA), indispensable para el buen funcionamiento del sistema inmunitario, fue tratada con leucocitos de su propia sangre infectados con retrovirus portadores del gen normal responsable de la elaboración de la enzima, las condiciones de la niña mejoraron y realiza una vida normal .¹

En junio de 1992, un equipo en la universidad de Michigan, comandado por James Wilson, reportó el tratamiento de una mujer de 29 años que había nacido con una forma severa de hipercolesterolemia causada por una completa disfunción de sus receptores LDL (lipoproteínas de baja densidad); los cirujanos extirparon células hepáticas de la paciente en las cuales se introdujo una copia normal del gen para el receptor de LDL. Los resultados fueron exitosos, el nivel de colesterol bajó 30% sin utilizar ningún fármaco para disminuirlo.

En la segunda mitad de la década de los noventa se aprobaron en Estados Unidos protocolos clínicos de terapia génica para poco más 300 casos, enfocados a tratamientos contra distintos tipos de cáncer, seguidas por tratamientos contra enfermedades monogénicas (enfermedades causadas por defectos en un solo gen).³

Los antecedentes históricos de la terapia génica se aprecian resumidos en el Cuadro 1.

Cuadro 1 Antecedentes históricos de la terapia génica. Fuente propia.





1.2 Generalidades

Para poder adentrarnos en el tema de la terapia génica es necesario tener conocimiento de algunos conceptos y tópicos, mismos que serán descritos a continuación.

La **Genética** es rama de la Biología que trata del estudio de la variación heredada. Más específicamente, del estudio del origen, la transmisión y la expresión de la información genética; término que deriva de la raíz griega *gen*, que significa “llegar a ser”. La genética humana estudia todas aquellas características que el hombre hereda tanto físicas como mentales, normales y anormales. Dicho en otras palabras, la genética humana analiza de forma científica las similitudes y diferencias entre los seres que constituyen la especie humana, sus causas y la manera en que se transmiten de generación en generación. ^{2,4}

El **gen** se define como la unidad física fundamental de la herencia, cuya existencia se puede confirmar por las variantes alélicas y que ocupa un locus específico en el cromosoma. Secuencia de ADN que codifica un producto.^{2,5}

Los **alelos** son una de las posibles formas alternativas de un gen, que se distingue de otros alelos por sus efectos fenotípicos, que son las propiedades observables de un carácter controlado genéticamente.²

La posición de un gen dentro de un cromosoma se define como **locus**.⁶

Los **cromosomas** son cadenas semejantes a hebras formadas por ADN nuclear de las células eucariotas, son los portadores de la información genética de un ser vivo.⁶

Los **ácidos nucleicos** son polímeros compuestos por nucleótidos, que en organismos se basan en uno de dos azúcares, ribosa o desoxirribosa, que da origen a los términos ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN).

El monómero de los ácidos nucleicos se denomina **nucleótido** y cada uno consta de tres partes: un azúcar (ribosa o desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (figura 1).⁶

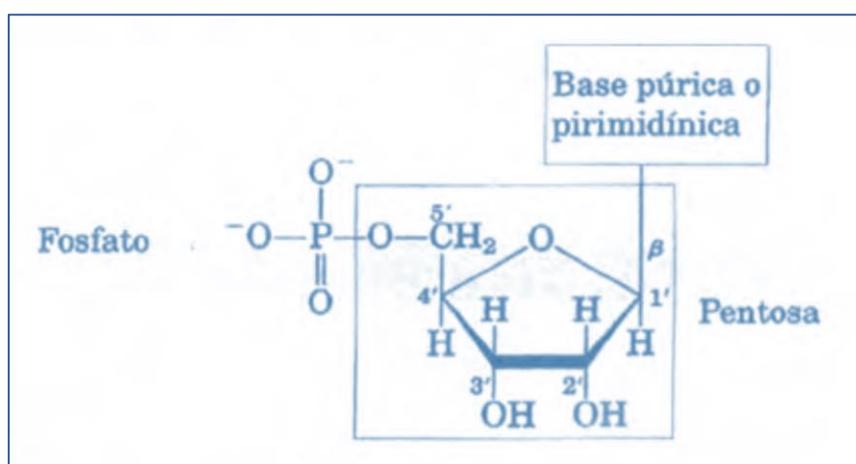


Figura 1 Representación de la estructura de un nucleótido.

Las **bases nitrogenadas** son derivas de dos compuestos parentales, pirimidinas (citosina, timina y uracilo) y purinas (adenina y guanina) (figura 2).⁵

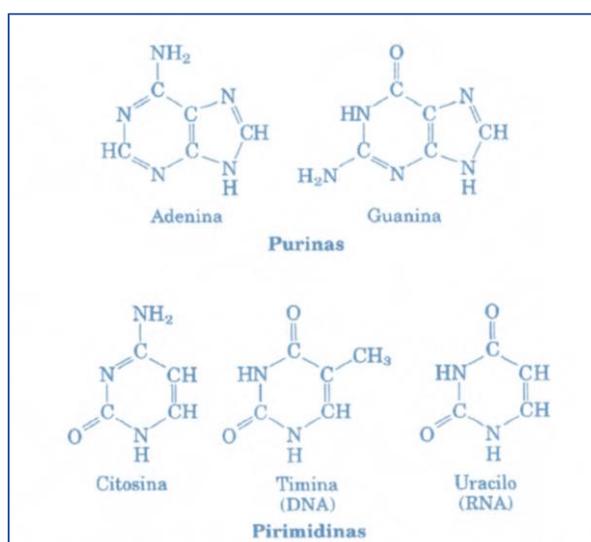


Figura 2 Principales bases purínicas y pirimidinas de los ácidos nucleicos.



El **ARN (Ácido ribonucleico)** o RNA (por sus siglas en inglés) es un ácido nucleico formado por una sola cadena polimérica de nucleótidos que contiene ribosa.

La molécula intermediaria entre un gen y el polipéptido al que codifica es el **ARN mensajero (ARNm)** o mRNA (por sus siglas en inglés). El ARNm se ensambla como copia complementaria de una de las dos cadenas de DNA que codifica al gen.

El **ARN de transferencia (ARNt)** o tRNA (por sus siglas en inglés) forma una familia de RNA pequeños que traducen la información codificada en el alfabeto de nucleótidos de un ARNm en el alfabeto de aminoácidos de un polipéptido.

Al RNA de un ribosoma se le denomina **ARN ribosómico (ARNr)** o rARN (por sus siglas en inglés). Los ARNr reconocen y se unen a otras moléculas, brindan soporte estructural y catalizan la reacción química en la que los aminoácidos se unen entre sí.

El **ADN (Ácido desoxirribonucleico)** o DNA (por sus siglas en inglés) es un ácido nucleico de doble cadena compuesto por dos cadenas poliméricas de nucleótidos que contienen desoxirribosa. Es el material genético de todos los organismos celulares.⁶

La principal función del ADN es contener información, que, al expresarse de manera selectiva y regulada permite generar una nueva célula o un nuevo organismo. La información del ADN primero se transcribe; es decir, se copia selectivamente a moléculas de RNA y posteriormente la información de algunas de estas moléculas se traduce a proteínas. A esta serie de pasos se le denomina “**el dogma central de la biología molecular**” (figura 3).⁷

En la década de 1960, Howard M. Temin y David Baltimore descubrieron la retrotranscripción, con lo que se modificó “el dogma central de la biología molecular”. Con sus experimentos demostraron que un virus cuyo material genético está constituido sólo por RNA (retrovirus), codifica la información genética viral, que antes se pensaba sólo podía almacenarse en el DNA. Aislaron una enzima que puede sintetizar DNA, usando RNA como templado, con lo que se describieron así las transcriptasas reversas virales.⁴

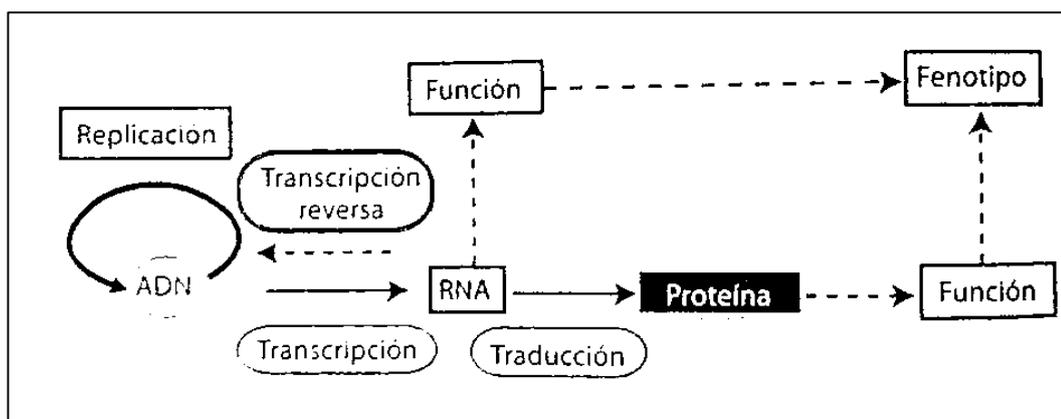


Figura 3 Dogma central de la biología molecular.

De todo lo anterior queda claro que el fenotipo celular depende de la información almacenada en el DNA y que una vez que esta información es decodificada se convierten en RNAs funcionales o en proteínas.⁴

Alteraciones Genéticas. Las mutaciones, definidas como todo cambio que acontece en el material genético. Pueden ser de 3 tipos:

- Génicas: afectan a un gen o genes.
- Cromosómicas Numéricas: afectan al número de cromosomas.
- Cromosómicas estructurales: afectan a la estructura de los cromosomas.

Alteraciones génicas autosómicas. Afectan a los genes autosómicos (22 pares de autosomas), afectan por igual a hombres y a mujeres. Debidos a alelos dominantes (por ejemplo: polidactilia, sindactilia, braquidactilia y acondroplasia) o debidos a alelos recesivos (por ejemplo: albinismo, fibrosis quística y anemia falciforme).

Alteraciones génicas ligadas al sexo. Afectan al cromosoma X (por ejemplo: hemofilia, daltonismo y distrofia muscular de Duchenne) o al cromosoma Y (por ejemplo: ictiosis e hipertrichosis articular).⁸ Figura 4.

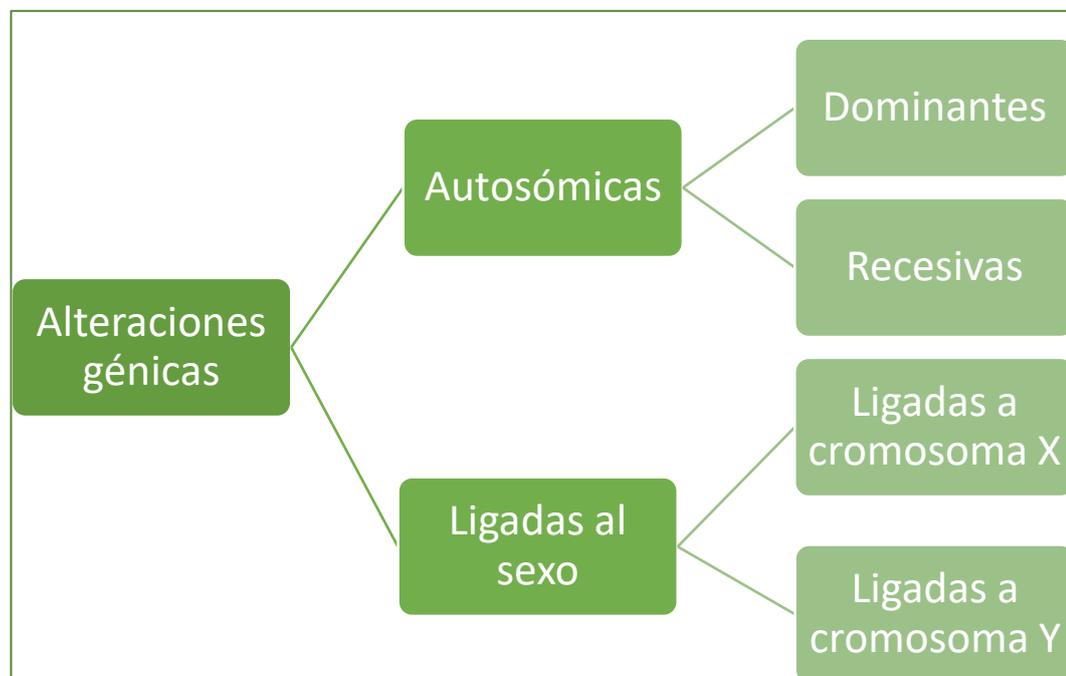


Figura 4 Tipos de alteraciones génicas. Fuente propia.

Alteraciones cromosómicas numéricas: Las células somáticas en el ser humano tienen un número diploide de cromosomas (46) y los gametos maduros (óvulo y espermatozoide) un número haploide (23).

Estas alteraciones pueden darse durante la división meiótica en la primera o segunda fase o incluso en la división mitótica.⁴



Cuando los cambios del número de cromosomas conducen a la presencia de un número que es múltiplo exacto del número haploide se denomina **euploidía**, pero cuando sólo uno o algunos cromosomas están involucrados, a la alteración se le llama **aneuploidía**. Las aneuploidías se presentan porque uno de los cromosomas junto con su homólogo pasan al mismo polo de la célula o se incorpora al mismo gameto, a este fenómeno se le conoce como no disyunción o no separación cromosómica.

Una célula que contenga más de dos conjuntos haploides se denomina **poliploide**.

Si el gameto que lleva un cromosoma adicional se une con uno normal formaran un individuo **trisómico** ($2n+1$). Cuando la fecundación implica la fusión de un gameto normal con uno al que le falta un cromosoma, se formará un sujeto **monosómico** ($2n-1$).

Alteraciones cromosómicas de estructura: los cromosomas están expuestos a diferentes factores ambientales mutagénicos de diferente naturaleza como lo son los factores físicos (radiación), químicos (drogas) o biológicos (virus). Existen mecanismos de reparación celular para tratar de subsanar el daño, pero éste puede ser grave, los mecanismos de reparación ineficaces, lo cual puede que llegue a producir una alteración estructural.⁷

Se llama **delección** a cualquier pérdida de material genético (por ejemplo: síndrome de Lejeune, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman).

La **duplicación** es cuando existen dos copias del segmento de un cromosoma (por ejemplo: síndrome de cromosoma X frágil, acromegalia y gigantismo).

La **inversión** se lleva a cabo cuando hay dos rompimientos en el mismo cromosoma y en el segmento de fractura, antes de volverse a unir, se invierte en 180 grados (por ejemplo: síndrome de Ambras o hipertrichosis).

Una **traslocación**, es el intercambio de material genético entre dos cromosomas. La **traslocación recíproca** se da cuando el material genético distal a los rompimientos cromosómicos es intercambiado entre dos cromosomas. La **traslocación Robertsoniana o por fusión céntrica**, se origina por rompimientos en o cerca del centrómero de dos cromosomas acrocéntricos. La **traslocación por inserción** se da cuando existen tres rompimientos cromosómicos en uno o dos cromosomas (por ejemplo: síndrome de Down, Leucemia promielocítica aguda, linfoma de Burkitt).

El **isocromosoma** es un cromosoma anormal que tiene duplicado el material genético de uno de los dos brazos, ya sea el corto o el largo, de un cromosoma (por ejemplo: síndrome de Turner, síndrome de Pallister Killian) (figura 5).⁴

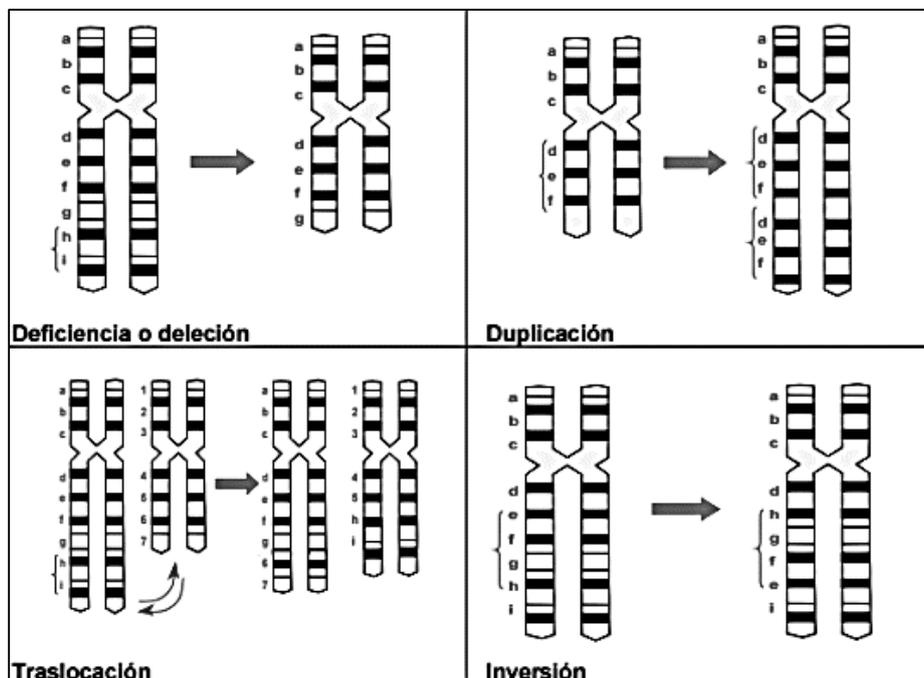


Figura 5 Alteraciones estructurales de un cromosoma.



1.3 Definición y tipos de terapia génica

La Terapia génica (TG) es la parte de la terapéutica que utiliza material genético en el tratamiento de enfermedades; intenta modular la función celular, pudiendo corregir la deficiencia causada por la pérdida o alteración de un gen al modificar la expresión de proteínas.⁹

La TG implica la introducción de material genético en los pacientes, con la finalidad de corregir las deficiencias celulares expresadas en el fenotipo para sanar las enfermedades hereditarias o adquiridas. Esta terapia incluye a la transferencia génica con el propósito médico de prevención, diagnóstico y terapéutica.¹⁰

La TG se puede dividir en diferentes tipos, según su célula diana (somática o germinal) o según la estrategia aplicada para la realización de la misma (*in vivo* o *ex vivo*).

1.3.1 En función a las células diana

Se denomina célula diana o célula blanco a toda célula en la cual una molécula (ligando) se une a su receptor, se haya determinado o no una respuesta bioquímica o fisiológica.¹¹

Según el tipo de célula a la que va encaminada la terapia génica la podemos dividir en:

- Somática
- Germinal



1.3.1.1 Somática

La TG somática es aquella dirigida a modificar la dotación genética de células no germinales, es decir, de las células somáticas o constituyentes del organismo. Por consiguiente, toda modificación genética de estas células no puede transmitirse a la descendencia.¹²

La TG ha centrado sus actuaciones sobre enfermedades hereditarias bien definidas cuyo defecto genético reside en un único gen, las llamadas enfermedades monogénicas.¹³

1.3.1.2 Germinal

La TG germinal es aquella dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y, por tanto, transmisible a la descendencia.¹²

No existe constancia de que se hayan realizado estudios de transferencia génica en la línea germinal humana con fines terapéuticos debido a las implicaciones éticas que conlleva, por ejemplo, la posibilidad de generar alteraciones mayores o neoplasias.¹⁴

1.3.2 Estrategia aplicada

Desde el punto de vista metodológico empleado para la transferencia de material genético, la terapia génica puede clasificarse en tres grandes grupos: terapia génica *in vivo*, terapia génica *ex vivo* y terapia génica *in situ*.



1.3.2.1 *In vivo*

La terapia génica *in vivo* implica la inyección de vectores con los genes correctores en la sangre. Una vez dentro del cuerpo, los vectores se encontrarían con sus células dianas para transferir su información genética (figura 6).¹⁵

Un sistema eficaz para la transferencia del gen *in vivo* debe presentar:

- a) Una alta eficiencia en la captura del gen por las células diana.
- b) Un alto rendimiento en el transporte del gen al interior del núcleo celular, con una degradación mínima.
- c) Una expresión mantenida y suficiente del gen terapéutico para aliviar el cuadro de la enfermedad.

La técnica de terapia génica *in vivo* tiene los inconvenientes de que el grado de control de la transferencia es poco, la eficiencia es poca (dado que no se pueden amplificar las células transducidas) y la dificultad de conseguir un alto grado de especificidad.¹⁶

1.3.2.2 *Ex vivo*

La terapia *ex vivo* se caracteriza por la extracción de células del paciente con genes alterados e incorporación de copias de genes normales, las que son retornadas al organismo (figura 6).¹⁵

Las etapas necesarias para implementar esta estrategia consisten en:

- a) Aislamiento de “células-vector” del paciente.
- b) Introducción del vector terapéutico en el laboratorio *in vitro* mediante técnicas de biología molecular, para corregir su defecto genético.
- c) Selección y crecimiento de las células corregidas genéticamente.
- d) Autotransplante de las células al paciente.¹⁶

Sus principales ventajas son el permitir la elección del tipo de célula a tratar, mantener un estrecho control sobre todo el proceso, y la mayor eficacia de la transducción genética. Los problemas más importantes de esta modalidad son la mayor complejidad y coste de los protocolos, así como la imposibilidad de transducir aquellos tejidos que no son susceptibles de crecer en cultivo; además, existe siempre el riesgo inherente a la manipulación de las células en cuanto a problemas de contaminación.¹⁶

1.3.2.3 *In situ*

La terapia génica *in situ* se caracteriza por la introducción de genes correctores directamente en el tejido donde se localiza el problema, lo que proporciona un alto grado de transfección en un tejido específico. La terapia *in situ* tiene el inconveniente de la falta de vías seguras y eficaces para la implantación de genes correctores en ciertos órganos.¹⁵

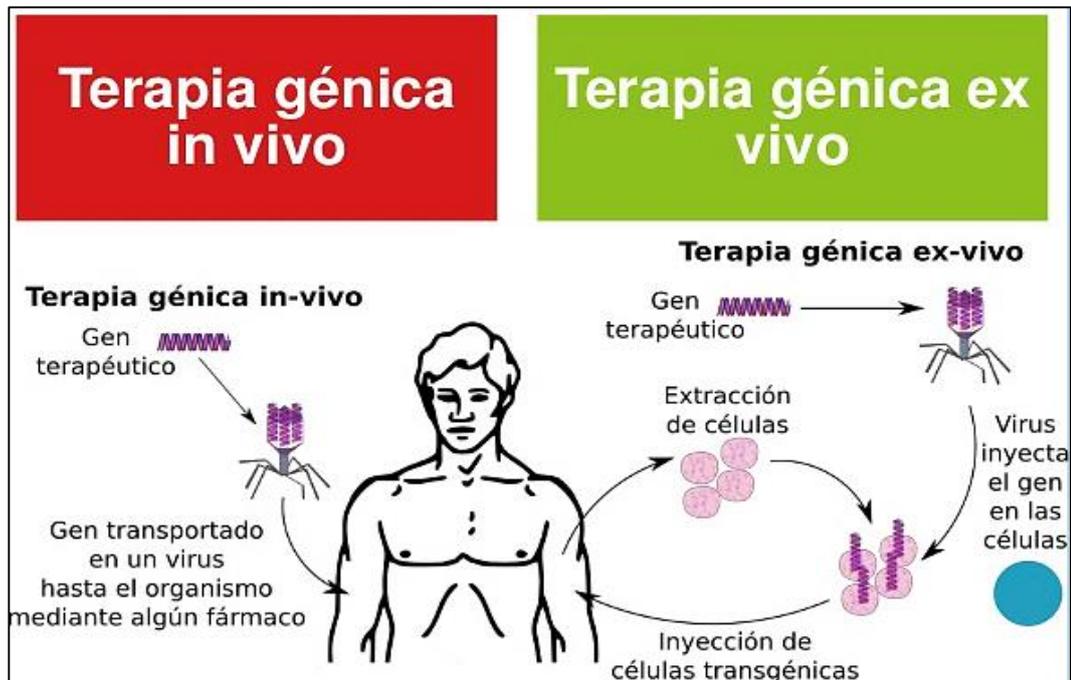


Figura 6 Terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.



1.4 Transferencia genética

La transferencia genética o transgénesis se define como la introducción de ADN exógeno, en una célula.¹⁷

En su aspecto más práctico, la transferencia génica busca la fabricación, con fines industriales o terapéuticos de productos génicos por parte de las células receptoras del gen transferido (denominado, en general, transgen), que pueden ser células en cultivo o bien formar parte de un organismo completo modificado genéticamente, conocido como transgénico.

Una de las aplicaciones de la transferencia genética es la terapia génica propiamente dicha, en la que se suministran células del mismo paciente o individuo donante para producir y suministrar al paciente un producto génico curativo.¹⁸

La transferencia genética es la introducción de material genético externo en células eucariotas por medio de plásmidos, virus u otras herramientas moleculares como la microinyección, la biobalística, los liposomas, etc.

Entre los factores a considerar para un procedimiento óptimo de transferencia genética en eucariontes están: el blanco o diana, la ventana de tiempo, el nivel de expresión deseado, la estabilidad esperada, el vector a utilizar, la técnica de aplicación, así como la factibilidad de la aplicación.¹⁷

1.4.1 Genes integrados

La ventaja de que el gen se integre en el cromosoma es que puede perpetuarse por replicación cromosómica tras la división celular. Como las células de la progenie también contienen los genes introducidos, se puede obtener una expresión estable a largo plazo.



La clave es dirigir la modificación a las células madre (una población minoritaria de células precursoras indiferenciadas que dan lugar a las células diferenciadas maduras del tejido). Además, las células madre no sólo dan lugar a las células maduras del tejido, sino que al mismo tiempo se renuevan ellas mismas.

La transferencia eficiente de genes a las células madre y la posterior estable expresión del gen estable ofrece, por tanto, la posibilidad de curar un trastorno genético.

No obstante, la integración cromosómica tiene sus inconvenientes debido a que la inserción suele ocurrir casi al azar: la localización de los genes insertados puede variar enormemente entre células. En algunos casos, los genes insertados pueden no expresarse debido a su inserción en regiones muy condensadas. En algunas ocasiones, la integración puede provocar la muerte de la célula huésped (por ejemplo, por inserción en un gen crucial, inactivándolo). Este tipo de acontecimientos tiene consecuencias únicamente para la célula en la que sucede la integración.¹²

1.4.2 Genes no integrados

Algunos sistemas de transferencia génica están diseñados para insertar genes en células donde pueden quedar como elementos extracromosómicos (episomas) y tener una expresión elevada.

Si las células están dividiéndose activamente, el gen introducido puede no segregarse igualmente a las células hijas, por lo que la expresión a largo plazo puede ser un problema.¹²



1.5 Métodos de transferencia

La administración segura y eficaz de genes es un requisito previo para la terapia génica exitosa. En la edad temprana de la terapia genética humana, los retrasos debido a los vehículos de entrega de genes problemáticos plagaron el emocionante resultado terapéutico. Sin embargo, las tecnologías de entrega de genes evolucionaron rápidamente desde entonces.¹⁹

La transferencia de material génico exógeno puede realizarse empleando métodos diferentes, pero en la mayoría de los casos es necesario la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de dicho material génico.²⁰

Entendemos por vectores a los sistemas que utilizamos como ayuda en el proceso de transferencia de un gen exógeno al interior de la célula. Ellos facilitan la entrada y biodisponibilidad intracelular del material genético a transducir y, por consiguiente, su funcionamiento correcto.²¹

Actualmente los vehículos de liberación de genes, llamados **vectores**, son categorizados en dos tipos:

- Vectores no virales (microinyección, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microproyectiles, optoporación, DEAE-Dextrano, liposomas e hidrogeles).
- Vectores virales (adenovirus, lentivirus, retrovirus, herpesvirus y virus asociados a adenovirus).

1.5.1 Microinyección

La microinyección consiste en la inyección directa de ADN mediante una microjeringa y un microscopio óptico, micromanipulador, para poder introducir el material genético a una célula blanco. Es un método muy preciso de transferencia génica.²² Figura 7.

Tiene el inconveniente de que solo transduce una célula al mismo tiempo, y requiere material y personal especializado, pero su eficacia es alta.²²

Se suele utilizar con frecuencia en estudios *ex vivo*, aunque también en la terapia génica germinal, un método *in vivo* donde se lleva a cabo la microinyección directa de “ADN desnudo” en los pronúcleos del óvulo recién fecundado o en el citoplasma.

Aunque los primeros individuos transgénicos obtenidos mediante este método fueron ratones, se realiza con éxito en vacunos, ovejas, cabras, conejos y cerdos. La eficiencia inicial de integración génica obtenida fue tan sólo de un 2%, aunque hoy día se alcanzan niveles cercanos al 30% del total de embriones tratados.²¹

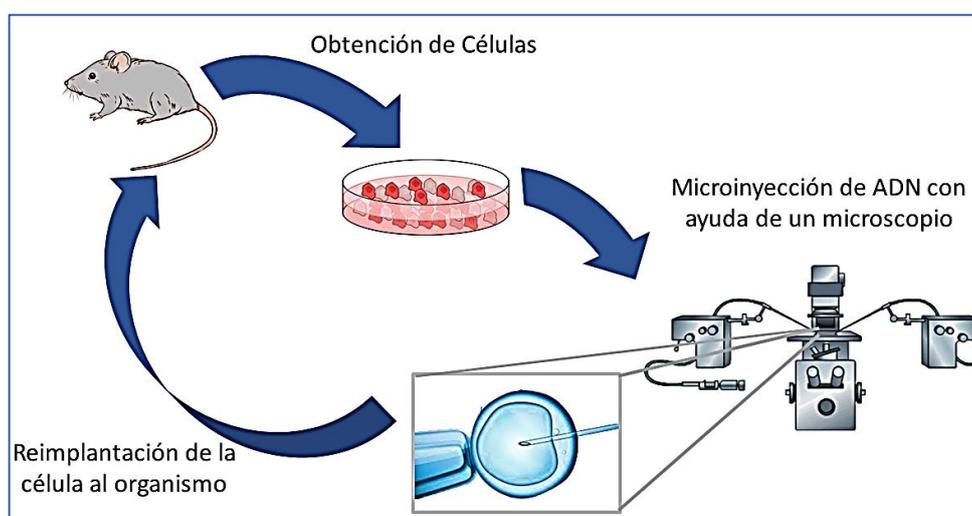


Figura 7 Esquema de la transfección por microinyección. Fuente propia

1.5.2 Precipitación con fosfato de calcio

Los precipitados de fosfato de calcio (CaPO_4) y de ADN se utilizan para la transfección génica tanto en células eucariotas como bacterianas. Estos consisten en formar un precipitado insoluble entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En este método el calcio se asocia con las cargas negativas del ácido nucleico. La adición de un buffer fosfato resulta en la precipitación del ADN con el calcio y el fosfato, formando pequeñas partículas. Lo que posibilita que el ADN pueda ingresar a las células por fagocitosis.^{22,23} Figura 8.

No es una técnica que provoque toxicidad en las células, la expresión del transgen es transitoria y con una eficacia de transfección es de 10%. Su utilización se ve reducida a cultivos celulares en aplicaciones *ex vivo*.²¹

Para que la transfección sea satisfactoria se debe controlar el tamaño del precipitado; puesto que se ha correlacionado los precipitados pequeños con una mayor eficiencia de transfección. Para esto se debe tomar en consideración que el tamaño de las partículas es sensible a la concentración de calcio y ADN, el pH, la temperatura y el modo en el que el buffer salino y la solución de ADN son mezclados durante la precipitación.²³

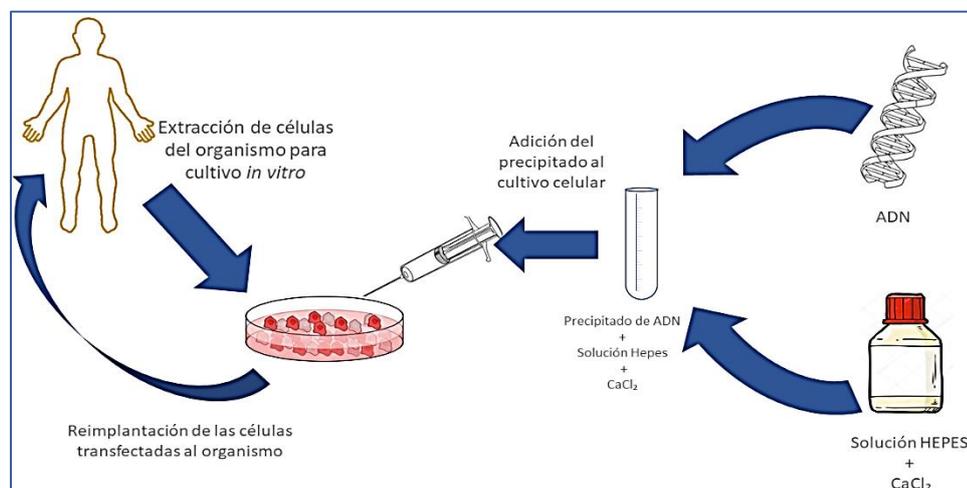


Figura 8 Esquema de la transfección por precipitación de fosfato de calcio. Fuente propia

1.5.3 DEAE-Dextrano

DEAE-dextrano (Dietilaminoetil-dextrano) es un reactivo polimérico policatiónico que se une y transfecta los ácidos nucleicos.²³

Estos complejos formados entre el ADN y el dextrano mantienen su carga positiva, lo que le permite unirse a la superficie de la célula cargada negativamente y pasa al interior de la célula mediante endocitosis.²³ Figura 9.

Tiene como ventajas su sencillez, reproducibilidad y bajo costo, además de que se requiere de pocas cantidades de ADN. Entre sus desventajas se puede señalar el número limitado de líneas celulares en las cuales se pueden obtener resultados eficientes y su limitación a transfecciones transientes de ADN en la célula huésped debido a la toxicidad del DEAE.²⁴

Es necesario que durante el proceso de transfección la morfología celular sea monitoreada puesto que el DEAE-Dextrano puede ser altamente tóxico para las células.²³

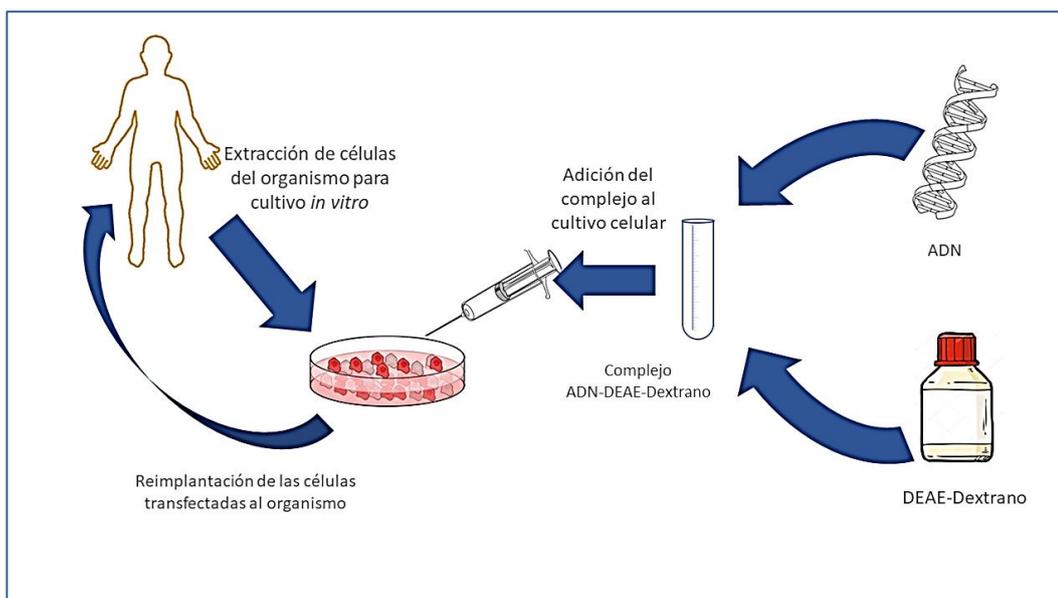


Figura 9 Esquema de la transfección con DEAE-Dextrano. Fuente propia



1.5.4 Electroporación

Consiste en el uso de una celda donde se colocan las células, que se adapta aun electroporador que genera una corriente eléctrica del orden de milivoltios, con una duración de milisegundos, para generar orificios en la membrana celular. A través de estos orificios se introduce el material genético, generalmente por la precipitación de complejos ADN-sales. (1)

Es el método físico más empleado; el mecanismo de acción se supone que los pulsos eléctricos perturban las membranas celulares, produciendo agujeros por los cuales los ácidos nucleicos pueden ingresar.

Debido a que la electroporación es un método sencillo y rápido, es posible transfectar un gran número de células en poco tiempo una vez que se han determinado las condiciones óptimas para la electroporación. Las células son suspendidas en una concentración de $10^6 - 10^7$ células/mL en un buffer salino de electroporación, buffer salino HEPES (del inglés: *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*) o medio de cultivo sin suero. Las células son después transferidas a una cubeta estéril y se añade el ADN a transferir.²³

Figura 10.

Las ventajas de esta técnica son que permite la transfección de líneas celulares recalcitrantes a otros métodos (se requiere de su optimización para cada tipo celular), se aplica a millones de células a la vez y habitualmente la eficiencia de transfección celular es del 100% de las células que sobreviven al pulso eléctrico.

En términos generales la mayor desventaja de la electroporación es su costo, ya que la mayoría de los equipos comercialmente disponibles son caros, en el orden de los miles de dólares, además de los accesorios como cubetas y adaptadores que también lo son.²⁴

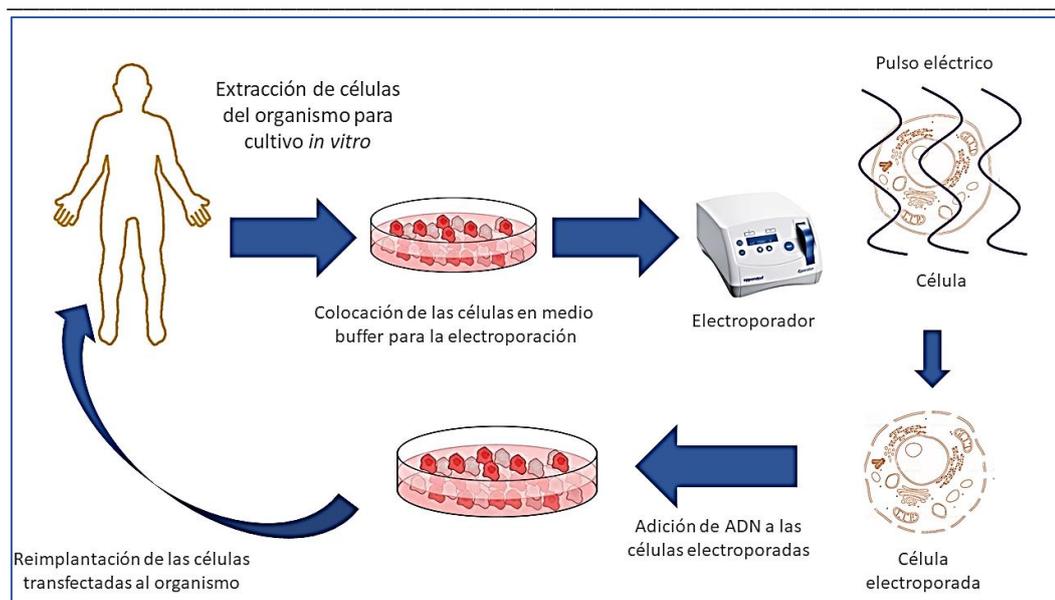


Figura 10 Esquema de la transfección mediante electroporación. Fuente propia

1.5.5 Bombardeo con microproyectiles

Este método de transfección celular consiste en la introducción del ADN adherido a micropartículas que se disparan a alta velocidad sobre las células. Ha sido utilizado de forma satisfactoria para introducir ácido nucleico a las células en cultivo de igual forma que ocurre *in vivo*. La fuerza aplicada permite que las partículas atraviesen la pared celular y depositen el material genético en el citoplasma de la célula. A este método también se le conoce como “pistola de genes”.^{22,24} Figura 11.

Los microproyectiles constituyen un método efectivo de transferir genes en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre las ventajas que presenta este método, y que le confieren un potencial de aplicabilidad general, destacan su fácil manejo y que un único disparo puede producir integraciones múltiples. Sin embargo, presenta algunas desventajas, como que en la zona de descarga se produce muerte celular; además, dependiendo de la rigidez de los tejidos, la procedencia del ADN extraño y la capacidad de transcripción intrínseca aparecen grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes.

Así, la expresión conseguida suele ser transitoria y con una frecuencia relativamente baja, cercana a 10^{-4} , tan sólo se logra la integración efectiva en el genoma 10^{-8} de las células expuestas, lo que hace que se requieran grandes dosis para alcanzar el éxito.²¹

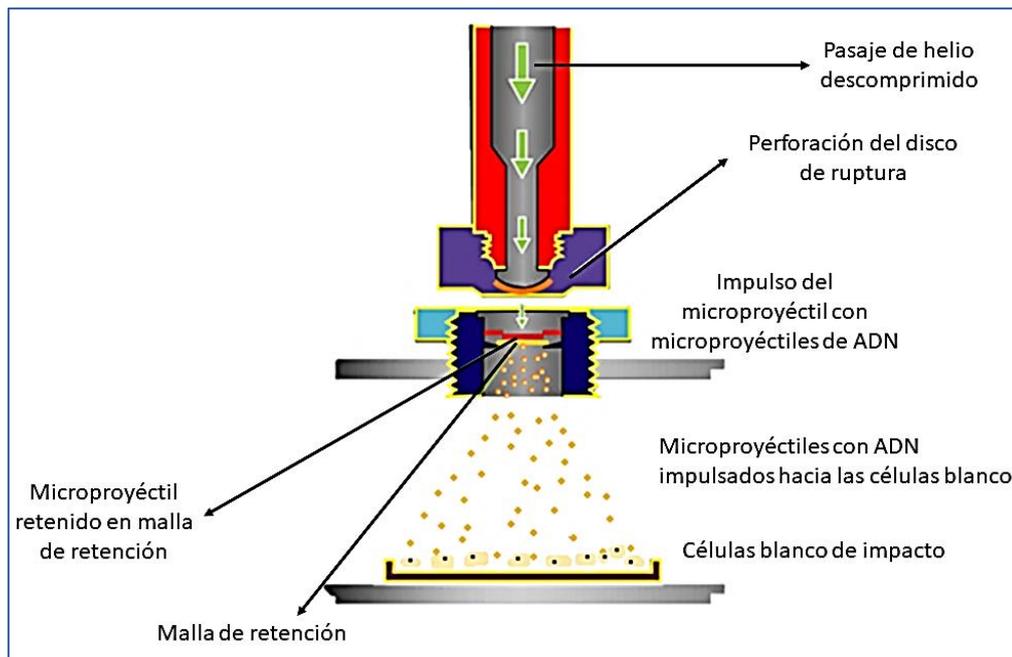


Figura 11 Esquema de la transfección con bombardeo de microproyectiles. Fuente propia

1.5.6 Inyección de ADN directa “desnudo”

Cuando se lleva a cabo la inyección directa de la parte codificadora a un tejido se conoce como técnica “ADN desnudo”. En ella, el ADN es vehiculado en una solución salina o sérica y normalmente administrado mediante inyección intramuscular (figura 12).

El mecanismo por el que entra en la célula diana permanece siendo un enigma. Esta técnica presenta un porcentaje bajo de transfección y no se logra la integración en el genoma. Se utiliza en la terapia génica *in vivo*,

aunque los valores y persistencia de la expresión de genes son probablemente demasiado cortos (días).

Entre sus ventajas destacan el ser un método directo, simple, económico y con una baja toxicidad. El “ADN desnudo” está siendo utilizado como procedimiento de vacunación, ya que, aunque el valor de expresión de los genes es bajo, resulta suficiente para alcanzar una respuesta inmunológica.²¹

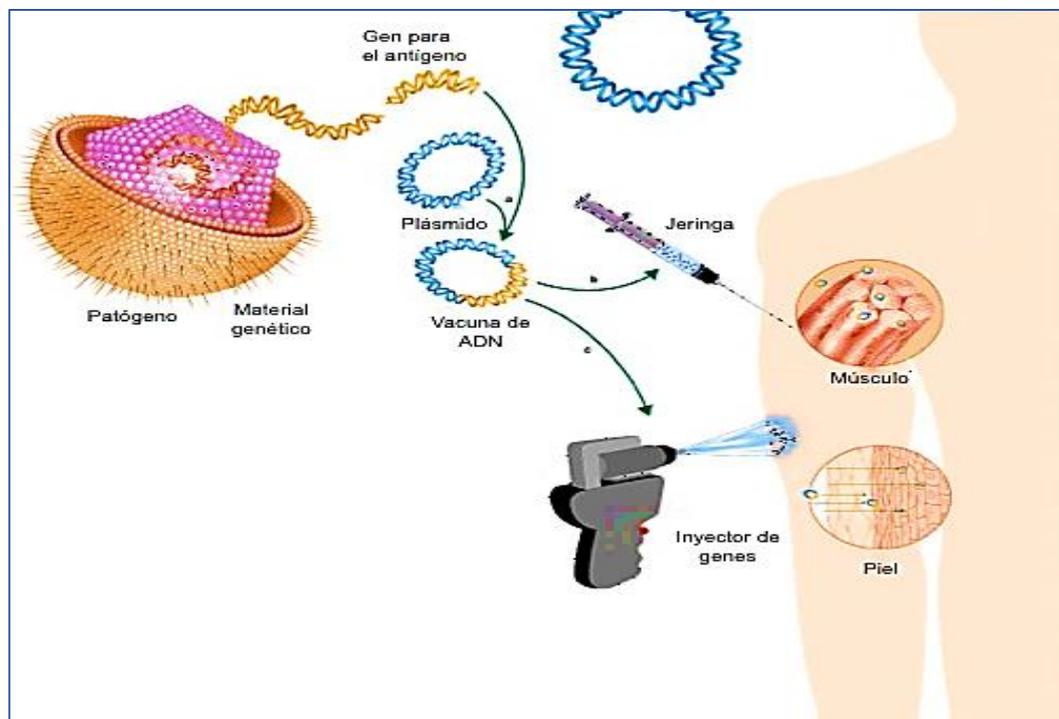


Figura 12 Esquema de la transfección por inyección de ADN directa “desnudo”.



1.5.7 Optoporación

La transfección mediada por láser (también conocida como optoporación o fototransfección) utiliza un pulso de láser para irradiar la membrana celular con la finalidad de formar un poro momentáneo. Cuando el láser induce la formación del poro, los ácidos nucleicos en el medio son transferidos dentro de la célula debido a la diferencia osmótica entre el medio y el citosol.²³

Figura 13.

Se utilizan principalmente los láseres de ion argón y los láseres del titanio-zafiro. A pesar de que las pruebas con los métodos de optoporación han resultado satisfactorias, los sistemas del láser empleados son relativamente incómodos e implican típicamente procesos de dos fotones, los cuales requieren la colocación extremadamente exacta del foco del láser en la membrana celular. Tales técnicas han demostrado ser relativamente difíciles de alcanzar.

Una variante más reciente de este método es la transfección de células por el método de optoporación con un láser de diodo violeta. Esta variante es fácil de poner en ejecución, particularmente si existe un microscopio óptico disponible, pues la fuente de láser es barata, compacta y portátil, en comparación con las fuentes previamente usadas para el fotoporador de láser.

Las células se pueden seleccionar visualmente apuntado por el fotoporador, y utilizando valores bajos de energía en un corto periodo de tiempo, no causan daños irreversibles de la membrana de la célula.²⁴

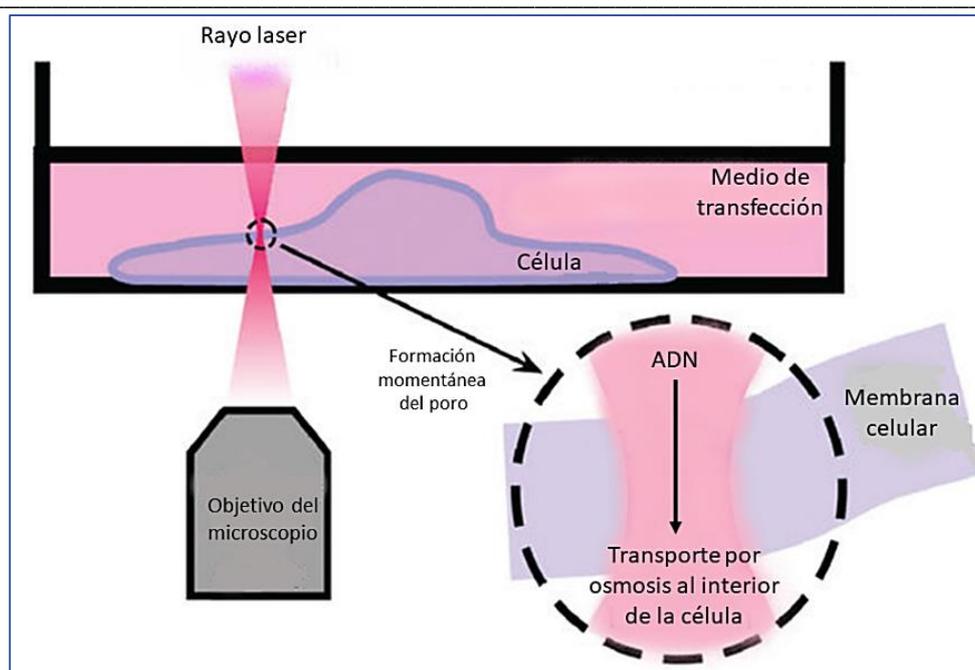


Figura 13 Esquema de la transfección por optoporación. Fuente propia

1.5.8 Lipofección

Esta técnica se basa en el uso de moléculas lipídicas de carga neta altamente positivas (catiónicas) que interactúan con el esqueleto fosfatado de la molécula de ADN. Estos polímeros con cargas positivas se unen electrostáticamente a las cargas negativas del ADN y forman vesículas que interactúan con la membrana celular, lo que facilita la transferencia de ADN al interior de la célula (figura 14).²²

Los lípidos se absorben a la membrana celular debido a propiedades de fusión, liberando el ácido nucleico directamente dentro del citoplasma. De esta manera se evita la degradación lisosomal.²¹

La lipofección es una técnica muy efectiva, aunque laboriosa. Es fácilmente reproducible, se describe tanto para expresión transitoria como estable, resultando la expresión estable 5-100 veces más eficiente, que por el resto de los métodos químicos.²⁴

Tiene la habilidad de transfectar ciertos tipos de células donde no resultan otros métodos químicos, capaz de introducir ADN de todas las tallas desde oligonucleótidos de cromosomas, introducción de ARN y proteínas.

La buena eficiencia en el reparto de ADN *in vivo* de liposomas policatiónicos aunque presentan una baja eficiencia de transfección, constituye una alternativa atractiva a los métodos de transferencia viral al no presentar limitaciones en el tamaño del ADN a transducir y tener una baja inmunogenicidad.

Los liposomas suelen ser administrados por vía intravenosa, con la ayuda de catéteres, presentando muy buenos resultados en las células de pulmón e hígado, quizás debido a que los complejos transfectantes se unen a partículas de gran tamaño, lo que impide que puedan abandonar eficazmente el sistema vascular.

Este vector no plantea problemas en modelos *in vitro*, sin embargo, *in vivo* su eficacia se encuentra disminuida.²¹

Las desventajas del método son, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular.²⁴

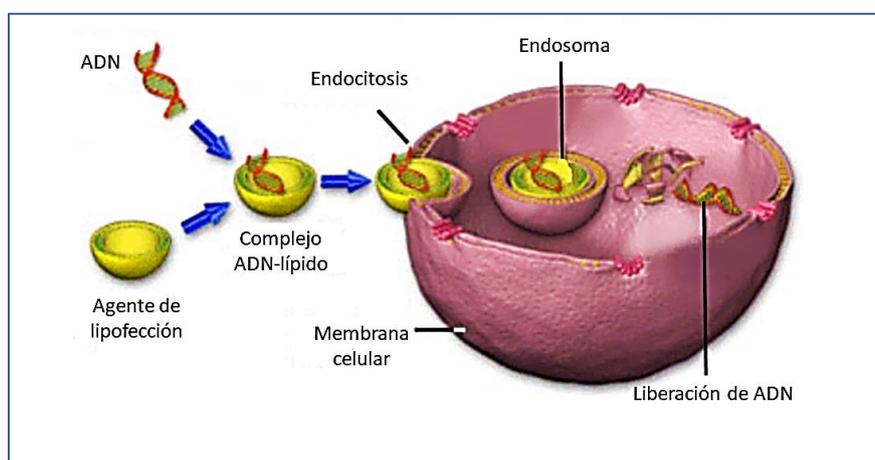


Figura 14 Esquema de la transfección por lipofección



1.5.9 Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en la terapia génica dada su buena interacción con los tejidos vivos, ya que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua. Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su superficie. Y, además, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunas soluciones orgánicas.²⁵

Los hidrogeles son capaces de administrar genes de manera localizada, así como para proporcionar un medio de soporte para el crecimiento de tejidos e inducir la formación de proteínas inductivas. Se han utilizado ampliamente en la ingeniería de tejidos como soporte para la formación de tejidos o para suministrar vectores de terapia génica no viral de manera local.^{26,27}

Este tipo de vectores se han usado como vectores de liberación controlada, para muchos hidrogeles la liberación ocurre principalmente por difusión que puede ser influenciado por propiedades físicas tales como el contenido de agua, relación de hinchamiento y tamaño de partícula de ADN. La composición química del hidrogel o del vector también puede influir en la transfección, ya que los vectores pueden asociarse reversiblemente con biomateriales para el transporte y la internalización celular.²⁷

Un ejemplo de hidrogel como vector para la terapia génica es hidrogel de la marca comercial Pluronic F127®, el cual con la adición de ácido hialurónico y grupos metacrilato adquieren propiedades termosensibles y fotopolimerizables. Estos hidrogeles encapsulan el ADN mediante la formación del hidrogel por efecto de la temperatura y la posterior fotopolimerización. Estudios demostraron que la liberación de ADN se

producía durante 10 días, de forma lenta y controlada, con diferencias dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del hidrogel. Los hidrogeles pueden ser utilizados como protectores para vectores virales y no virales y pueden ser usados en terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.²⁸

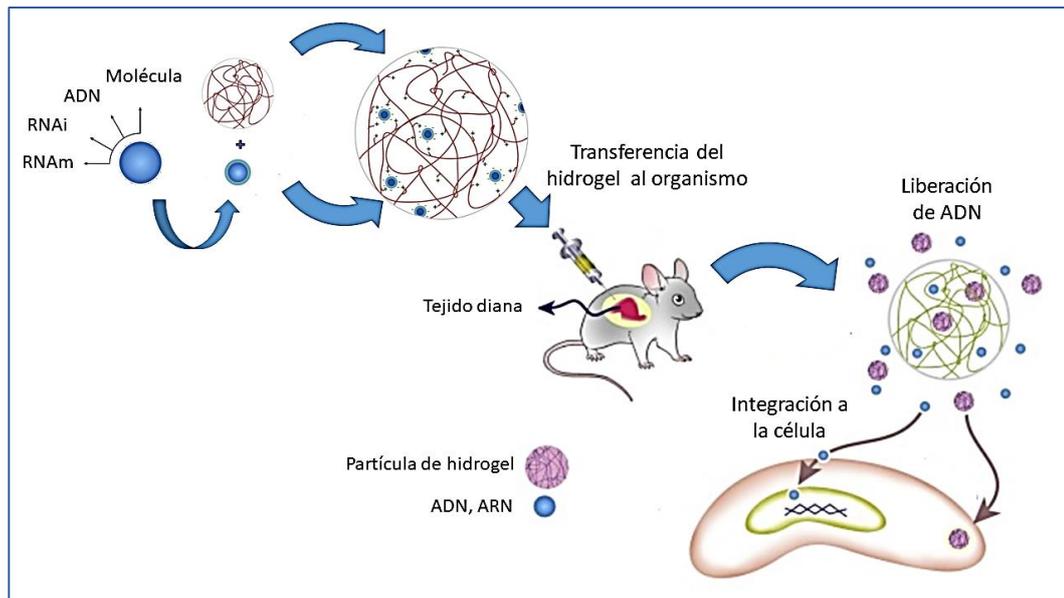


Figura 15 Esquema de la transfección con hidrogeles. Fuente propia

1.6 Vectores virales

Los vectores de tipo viral son actualmente los más efectivos, fueron los primeros en utilizarse en ensayos clínicos a comienzos de 1990 y continúan siendo los más utilizados en dichos ensayos. Los virus son, de hecho, sistemas naturales de transferencia genética.²⁰

Para modificar un virus y transformarlo en un vector con potencialidad terapéutica, el primer paso es bloquear su capacidad de propagación eliminando los genes responsables de su replicación. Así, el vector viral sólo podrá multiplicarse o crecer en cultivos de líneas celulares modificadas genéticamente que sobreexpresan la parte genoma viral que ha sido



delecionado; a estas células se las conoce como “células de empaquetamiento”.²¹

El segundo paso en el proceso de obtención de un vector viral es la eliminación de parte del genoma viral para crear espacio donde introducir el material terapéutico (gen o genes, más los elementos de control). Se han de eliminar genes que no sean esenciales y, especialmente, aquellos que puedan resultar tóxicos o perjudiciales para la célula a tratar.

En general, los vectores virales presentan como ventaja su gran eficacia de transferencia y la posibilidad, en algunos casos, de integrar el transgen en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, arrastran importantes limitaciones que incluyen su falta de especificidad celular en la mayoría de los casos, la limitación del tamaño en el material genético a incorporar, debido a que han de empaquetarlo en la cápsida, su elevada inmunogenicidad y, sobre todo, el riesgo biológico que conllevan (reconstitución de partículas replicativas por recombinación genética y oncogenicidad inducida por integración inespecífica).²⁰

1.6.1 Vectores adenovirales

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Se conocen casi 50 serotipos distintos de adenovirus humanos divididos en 6 subgrupos (A a F) en función de sus características inmunológicas, biológicas y secuencias genómicas. Los adenovirus humanos mejor caracterizados y más utilizados en terapia génica son los Ad tipo2 y Ad tipo5, ambos pertenecientes al subgrupo C.¹⁴

Los adenovirus son virus DNA sin envuelta con un genoma bicatenario de hasta 36 kb (miles de pares nucleótidos). Se han seleccionado los serotipos 2 y 5 para la obtención de vectores por no estar asociados con ninguna

enfermedad severa ni originar tumores en animales. La estructura del adenovirus se presenta en la figura 16. ²⁰

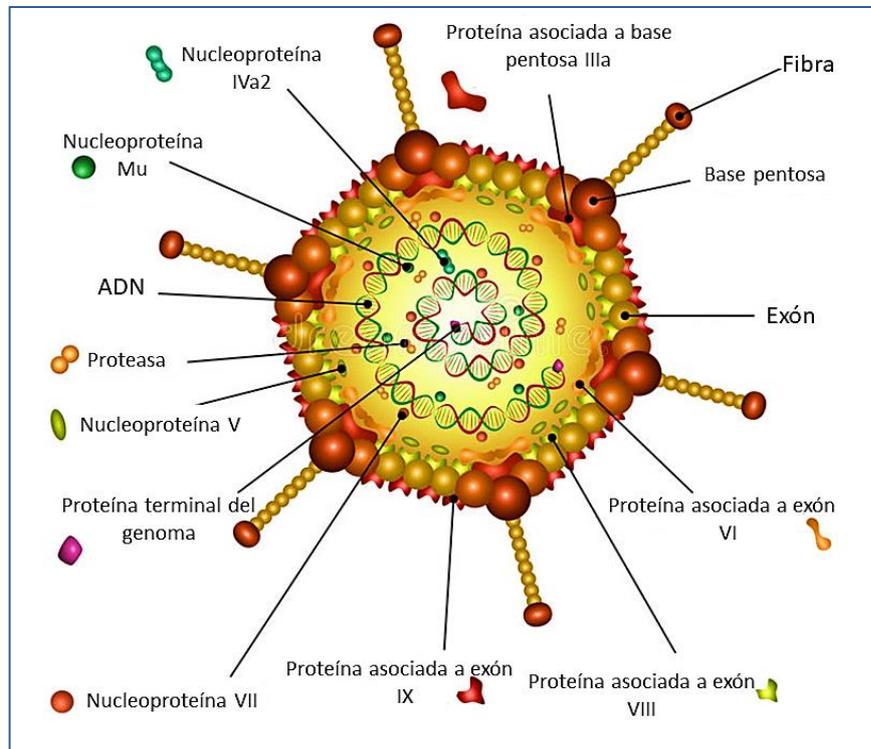


Figura 16 Estructura del adenovirus.

El ciclo infectivo de los adenovirus puede diferenciarse en dos fases:

- a) Primera fase: (o fase temprana) Consiste la entrada del virus en la célula huésped, el transporte del genoma viral al núcleo y la transcripción y traducción selectiva de los genes tempranos. Esta fase suele requerir, en células permisivas, entre 6-8 horas.
- b) Segunda fase: (o fase tardía) Consiste en todos los procesos posteriores a la replicación y terminan con el ensamblaje de las proteínas estructurales y la maduración del virus infectivo en el núcleo. Esta fase suele ser más rápida liberando partículas virales en 4-6 horas



El genoma adenoviral se puede dividir en dos regiones, dependiendo de que su transcripción sea anterior o posterior a la replicación del mismo. Las regiones de transcripción temprana se denominan regiones tempranas E1, E2, E3 y E4 y las regiones transcritas durante la fase tardía L1 a L5.

La infección adenoviral finaliza con la lisis celular y la liberación de nuevas partículas Adenovirales. ^{14,29}

Los adenovirus son los vectores virales más empleados actualmente en terapia génica *in vivo*, y debido a sus propiedades son uno de los mejores vectores para la terapia génica del cáncer y más concretamente para la inmunoterapia génica.

Las propiedades de los vectores adenovirales son:

- a) Un tropismo muy amplio, infectando numerosos tipos celulares.
- b) Infectan tanto células quiescentes como células en división.
- c) Muy alta eficacia de transducción; expresan cantidades altas del transgen.
- d) No requieren de integración en su ciclo infectivo y el material génico se expresa de forma episomal.
- e) Son muy inmunogénicos.
- f) Su construcción, manipulación y producción son relativamente sencillas, son virus estables y se obtienen títulos altos (10^{11} - 10^{15} p.i./ml).
- g) No se han descrito patologías graves asociadas al adenovirus salvaje.
- h) Su toxicidad como vector es baja y su bioseguridad es alta.

En general los adenovirus utilizados como vectores para la terapia génica pueden clasificarse en tres tipos:



a) Adenovirus de primera generación: La primera generación de vectores adenovirales se obtuvo mediante delección de la región E1, que bloqueaba su capacidad replicativa y la E3, aparentemente no esencial. Los adenovirus de primera generación son, hasta el día de hoy, los más empleados en terapia génica. Los adenovirus de primera generación demuestran tener una alta inmunogenicidad.

14,20

b) Adenovirus de segunda generación: Para disminuir la inmunogenicidad de los adenovirus de primera generación se desactivaron genes para la replicación del ADN del virus. Posteriormente se demostró que la presencia de E3 incrementaba significativamente la expresión del transgen y disminuía la respuesta inmune, por lo que volvió a introducirse en la segunda generación de vectores a expensas de otras regiones como la E4 o la E2.^{20,30}

c) Adenovirus de tercera generación: Los adenovirus de tercera generación también denominados, vacíos o “gutless”, “helper dependent” o “fully deleted” (en inglés) constituyen el último tipo de vectores adenovirales desarrollados hasta hoy. En este tipo de vector todo el ADN del virus ha sido eliminado, manteniendo solamente las secuencias necesarias para la replicación y la encapsidación. Estos virus podrían transportar material génico exógeno de hasta 37 Kb, por ejemplo, varios transgenes distintos o genes completos. La elaboración de este tipo de vectores es laboriosa y necesita ser optimizada.^{14,30}

La mayoría de los vectores adenovirales son utilizados en el tratamiento contra el cáncer. También son utilizados como vacunas, al expresar una proteína antigénica extraña y desatar una respuesta inmune o en terapia

génica donde el vector adenoviral expresa una proteína no mutante para corregir un defecto genético.

Miles de personas han sido y están siendo exitosamente vacunadas contra enfermedades respiratorias agudas, por la administración gastrointestinal de vacunas Ad serotipo 4 y Ad serotipo 7.³¹

1.6.2 Vectores retrovirales y lentivirales

Los retrovirus (Rv) pertenecen a la familia *Retroviridae*. Son virus de ARN monocatenario de polaridad positiva (+RNA) envueltos, de cápside icosaédrica que contiene la transcriptasa inversa (RT), la integrasa y dos copias del genoma viral. Éste tiene 3 tipos de genes: genes *gag* (que codifican las proteínas de la cápside), genes *pol* (que codifican las enzimas necesarias para el ciclo viral, como la proteasa y la integrasa) y genes *env* (que codifican las glicoproteínas de la envuelta). La estructura del retrovirus se muestra en la figura 17.^{32,33}

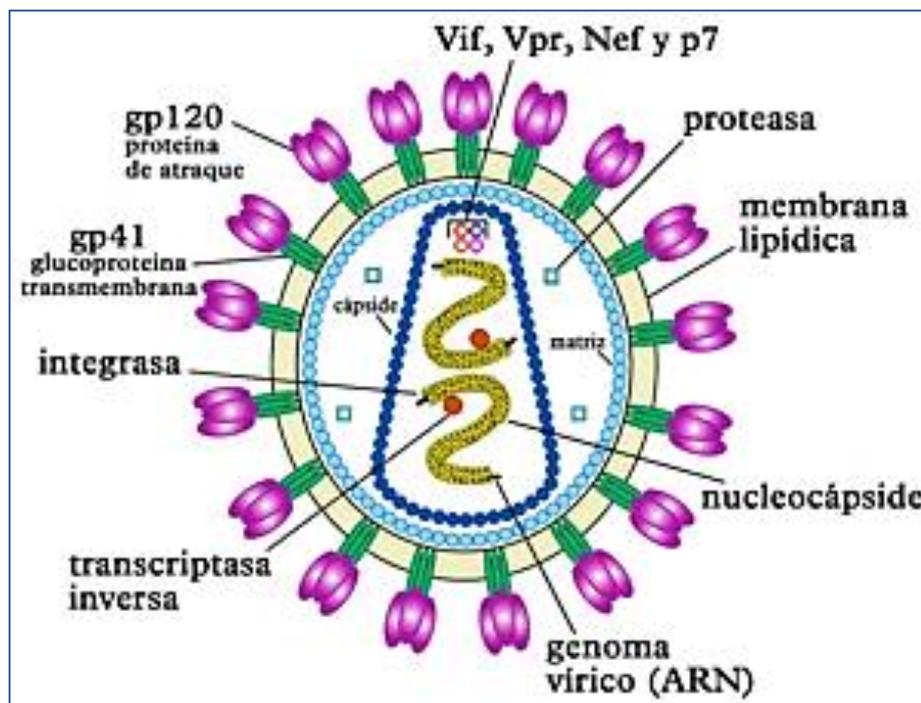


Figura 17 Estructura del retrovirus.



La familia *Retroviridae* está compuesta por las subfamilias *Spumaviridae*, *Lentiviridae* y *Oncoviridae*. Los derivados de oncovirus murinos tipo C o γ -retrovirus han sido los más utilizados en pruebas clínicas para la terapia génica, en concreto el virus de leucemia murina (MLV).^{32,33}

El ciclo replicativo de los retrovirus comienza cuando el virus es reconocido por receptores celulares, seguido de la fusión de la envuelta viral con la membrana celular y a la internalización del nucleóide. A continuación, tiene lugar la retrotranscripción del genoma para formar un ADNc (ADN complementario) bicatenario, dentro de la nucleocápside, después se desensambla la cápside y se transporta al núcleo. Mediante la integrasa, el genoma viral se integra en el genoma de la célula hospedadora, y entonces comienza la transcripción. Los ARNm son exportados al citoplasma y traducidos, dando lugar a poliproteínas *gag* y *pol*, que forman nuevas nucleocápside al unirse a la señal de empaquetamiento de los ARN positivos, y a las proteínas de la envuelta, que se dirigen a la membrana.

Tras el empaquetamiento, que tiene lugar en el citoplasma, las cápsides salen de la célula por evaginación de la membrana, quedando rodeadas de nuevo por una envuelta fosfolipídica procedente de la célula hospedadora que contiene las glicoproteínas codificadas por el virus que habían llegado anteriormente a la bicapa.

Las nuevas partículas retrovirales se activan cuando la proteasa rompe la poliproteína *gag pol* dentro de la propia partícula viral y da lugar a moléculas independientes de proteasa, integrasa y retrotranscriptasa. Para generar un retrovirus recombinante defectivo, se sigue el esquema general descrito anteriormente.³²

Los vectores retrovirales han constituido el vehículo de elección para una transferencia génica clínica debido a su eficacia, seguridad y expresión génica estable a largo plazo.³⁴



Las ventajas de los vectores retrovirales son las siguientes:

- a) Tienen buena infectividad.
- b) Son integrativos, con lo cual aseguran una larga duración de la expresión.

Los vectores retrovirales presentan las siguientes desventajas:

- a) Baja capacidad de carga (7-8kb).
- b) Son bastante lábiles y difíciles de producir.
- c) Son inactivados por el sistema del complemento.
- d) Sólo transducen células en división.
- e) Oncogénicos.
- f) Baja especificidad.

Los vectores retrovirales se aplican principalmente en terapia génica *ex vivo* transfectando células madre hematopoyéticas, por ejemplo, en el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID).^{20, 32}

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) pertenece a una subfamilia dentro de los retrovirus, los lentivirus, y al igual que otros miembros de dicha familia de VIH pueden infectar células quiescentes. Actualmente esto hace que los lentivirus sean vectores atractivos para una terapia génica.³⁴

La principal aplicación de los lentivirus está en la transferencia de genes a células del sistema nervioso *in vivo*, y a progenitores hematopoyéticos *ex vivo*, que también se aplica en el SCID.^{20, 32}

1.6.3 Vectores herpesvirales

Los herpes virus (HSV), familia *Herpesviridae*, son virus con genoma constituido por una cadena grande y lineal de ADN bicatenario de 100-230 Kb. Los viriones están constituidos por una cápside icosaédrica, rodeado por una envoltura lipoproteica que contiene glucoproteínas de un tamaño aproximado de 150 nm. La estructura del herpesvirus se muestra en la figura 18.³²

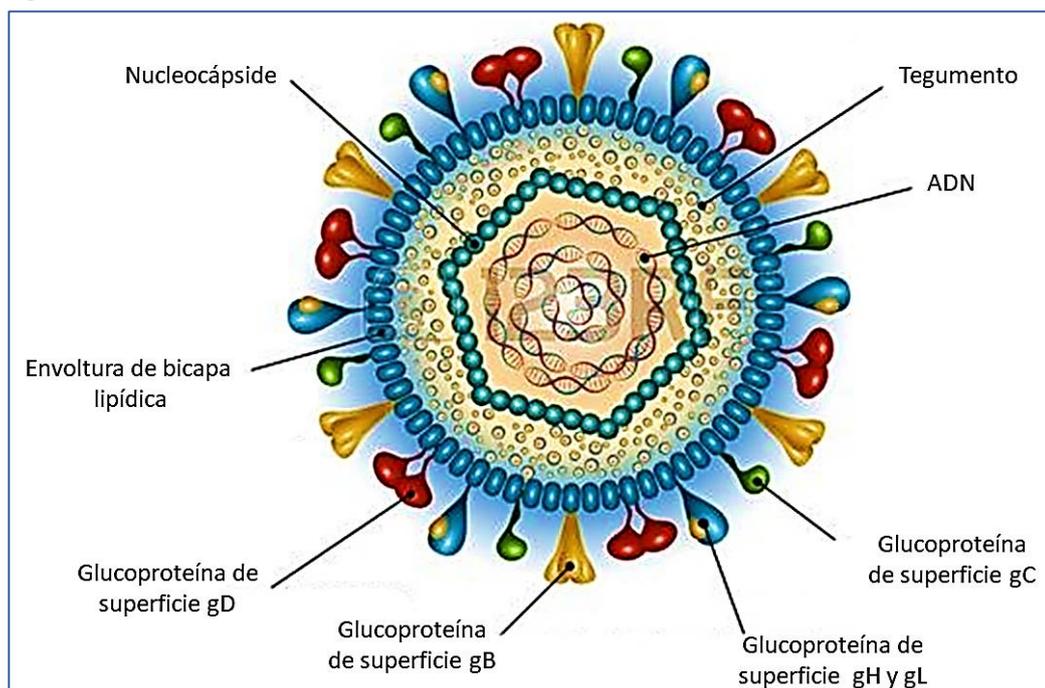


Figura 18 Estructura del herpesvirus.

La familia *Herpesviridae* está compuesta por las subfamilias:

- *Alfaherpesviridae*. Conformada por los *Human Herpesvirus 1* (VHH-1), 2 (VHH-2) y 3 (VHH-3).
- *Gammaherpesviridae*. Conformada por los *Human Herpesvirus 4* (VHH-4) y 8 (VHH-8).
- *Betaherpesviridae*. Conformado por los *Human Herpesvirus 5* (VHH-5), 6 (VHH-6) y 7 (VHH-7).



Los Herpesvirus establecen una infección latente en las neuronas, generalmente benigna. El virus se replica en el epitelio ocular o en el orofacial, invade terminaciones nerviosas locales, asciende a los ganglios utilizando el transporte axonal y se mantiene en las neuronas sensoriales en un estado latente. El virus es reactivado sólo bajo ciertos estímulos celulares, en los cuales se induce la expresión de proteínas tempranas, y se inicia el ciclo de lisis y replicación.

Para la construcción de un vector basado en el HSV se han utilizado dos estrategias, una de ellas es similar al utilizado para los vectores de adenovirus, en este caso se elimina las secuencias de genes que expresan las proteínas tempranas de su ciclo replicativo, haciendo un vector deficiente para replicarse. Genes de hasta 150 Kb pueden ser transducidos por un vector de HSV. La segunda estrategia consiste en construir un "mini-HSV", con las mínimas secuencias necesarias para la formación de la partícula viral y la infección de la neurona. Requieren de algunas proteínas para la formación de la partícula viral y la infección de la neurona a través de una célula empaquetadora. Los sistemas de vectores basados en HSV necesitan de mayores pruebas de seguridad, pues la fisiopatología de la infección viral no está del todo esclarecida.

Las características de los vectores herpesvirales son:

- a) Capacidad de transfectar células quiescentes, específicamente neuronas y células gliales.
- b) Capaz de transfectar múltiples líneas celulares como fibroblastos, macrófagos y neuronas.
- c) El material genético transfectado puede ser estable y permanecer en estado latente de forma episomal.
- d) En estado de latencia el material genético transfectado no afecta la funcionalidad de la célula.
- e) Capaces de transfectar hasta 150 Kb.



-
- f) Asociados con procesos linfoproliferativos y malignidad, específicamente la subfamilia γ -herpesvirus.

El virus del herpes simple tipo 1 (VHH-1 o VHS-1), perteneciente a la familia α -herpesvirus, está siendo ampliamente utilizado como vector para la transferencia genética en el sistema nervioso. El virus del Epstein-Barr (VHH-4 o VEB), perteneciente a la familia γ -herpesvirus, es capaz de establecer un estado latente en células en división en las cuales el episoma viral es capaz de replicarse coordinadamente con la división de la célula y es heredado a la progenie de dichas células; por lo tanto, los vectores derivados del virus del Epstein-Barr tienen el potencial de corregir la deficiencia genética de un grupo celular durante un periodo estable.

Recientemente se han desarrollado vectores derivados del *Herpesvirus saimirí* (HVS), virus endémicos de poblaciones de monos ardilla, los cuales son capaces de infectar líneas celulares humanas con alta eficacia, incluyendo linfocitos T y líneas celulares de carcinomas. El material genético del HVS es capaz de mantenerse de forma episomal en las células transfectadas, los cuales se segregan a la progenie celular durante la división celular tanto en métodos *In vivo* como *ex vivo*.³⁵

1.6.4 Vectores asociados a adenovirus

El virus adenoasociado (VAA) es un virus perteneciente a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*; éstos requieren de un virus colaborador como un adenovirus (Ad) o un virus del herpes simple que les proporcione las proteínas necesarias para replicarse eficientemente. En ausencia de un virus colaborador los VAA permanecen de forma latente en la célula.³⁶

Los VAA son virus pequeños de ADN de cadena sencilla de 4.7 Kb y su genoma contiene dos genes: *rep* (replicación) y *cap* (cápside). El gen *rep* codifica para cuatro proteínas reguladoras que participan en la replicación, integración y en la formación de genomas virales de cadena sencilla. El gen *cap* codifica para tres proteínas estructurales que son necesarias para la generación de las partículas infecciosas. La estructura de los VAA se muestra en la figura 19.^{36, 37}

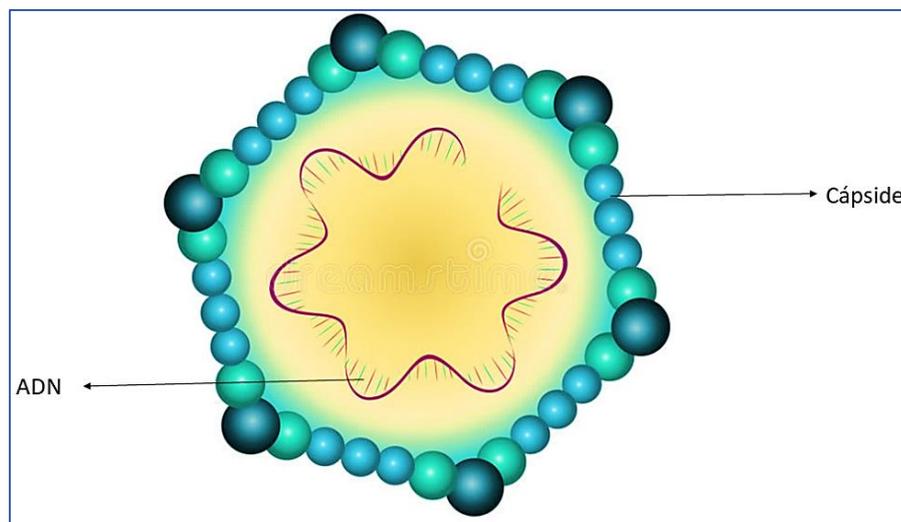


Figura 19 Estructura de los virus adenoasociados.

Los VAA son uno de los vectores más utilizados. Principalmente porque inducen una expresión eficiente del transgen por tiempos prolongados en diferentes tejidos como lo son: el hígado, el músculo, la retina y el sistema nervioso central. Sin embargo, su capacidad de empaquetamiento se restringe cuando se realiza a gran escala, lo que trae como consecuencia una producción ineficiente.

Las características de los vectores asociados a adenovirus son las siguientes:

- a) Capaz de albergar hasta 5 Kb
- b) Transfección de un elevado número de líneas celulares.



-
- c) Expresión eficiente del transgen por tiempos prolongados.
 - d) Capacidad de transfección en células quiescentes y en división
 - e) Capacidad de integrarse a una región específica de la célula huésped (el brazo q del cromosoma 19) lo que elimina la posibilidad de mutagénesis.
 - f) Baja inmunogenicidad.
 - g) No son autónomos, es decir, dependen de otros virus para su replicación.
 - h) Difícil producción.
 - i) Difíciles de eliminar totalmente.
 - j) Baja especificidad.

Diferentes serotipos de VAA tienen distintos patrones de expresión debido a diferencias en las células y en las actividades intracelulares. Por ejemplo, el serotipo VAA-1 es adecuado para inducir la expresión en el músculo esquelético y la retina, mientras el serotipo VAA-5 transduce eficientemente a las neuronas y a las células de pulmón. Por el contrario, los VAA-2 se caracterizan porque se expresan por mayor tiempo, pero los niveles de expresión son pobres.

Otro hallazgo importante de los VAA es que sensibilizan a las células para drogas terapéuticas, de tal forma que la infección con el virus VAA-2 incrementa la fragmentación de las células de Hela y de las A549 que induce la quimioterapia con cisplatino.^{17, 20, 36, 37}

En la actualidad se han desarrollado los diferentes serotipos de VAA como vectores recombinantes para tratar diversas enfermedades como la inmunodeficiencia combinada severa, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Parkinson, hemofilia A y B, cáncer, fibrosis hepática, entre otras.³⁷



1.7 Terapia génica antisentido

El término antisentido se aplica a secuencias cortas de ADN o ARN (oligonucleótidos) diseñadas para ser complementarias de secuencias génicas específicas, con el fin de interferir el flujo de información genética. Los agentes terapéuticos antisentido inhiben la síntesis proteica al interferir los procesos de transcripción y/o traducción. Existen tres clases principales:

- a) Secuencias antisentido (ARN de interferencia pequeño o siRNA por sus siglas en inglés): derivan de ácidos nucleicos que se unen (hibridan) con hebras de ARNm citosólicas (hebras con sentido: portadoras de la información necesaria para la síntesis de proteínas en los ribosomas) o de ARNhn (precursor nuclear del ARNm), a través de puentes de hidrógeno, por complementariedad de las bases correspondientes del ácido nucleico. Normalmente, las secuencias antisentido son secuencias cortas de ácido nucleico, por lo que habitualmente se les denomina oligonucleótidos antisentido.

- b) Secuencias antígeno (micro ARN o miARN): de forma similar a las secuencias antisentido, las secuencias antígeno se hibridan al ADN de doble hebra localizado en el núcleo, creando secuencias en triple hélice que bloquean la transcripción del gen correspondiente, bien directamente o bien interfiriendo en la unión de proteínas a secuencias específicas del ADN.

- c) Ribozimas: los ARN antisentido pueden catalizar enzimáticamente la hidrólisis de secuencias específicas de ARNm. Estos ARN catalíticos se denominan ribozimas, y actúan sobre sustratos naturales concretos, pero en el caso de la terapia antisentido se diseñan de forma que combinen dicha actividad catalítica con la



posibilidad, aportada por el apareamiento de bases, de reconocer específicamente diversas secuencias de ARN diana.

En general, pueden seguirse dos enfoques en terapia antisentido:

- a) La administración directa de oligonucleótidos. En éste caso, además de la microinyección directa, se han investigado diversos métodos de liberación *in vitro* como son la formación de complejos con lípidos cargados positivamente, la incorporación en el interior de liposomas y la electroporación.

- b) La expresión de los oligonucleótidos tras la transfección de determinadas células. En este caso se han utilizado vectores como adenovirus o retrovirus; en tal caso, el vector es administrado al paciente, cuyas células serán las encargadas de generar el oligonucleótido antisentido.

La expresión de oligonucleótidos presenta ciertas ventajas y desventajas con respecto a la administración directa de los mismos:

- a) La producción directa a nivel nuclear permite mecanismos adicionales, ya que el oligonucleótido puede interferir en el transporte del ARNm al citoplasma y puede interferir en el proceso de transcripción de la hebra de ADN complementaria.

- b) Los ARN antisentido expresados son de mayor longitud, lo que ofrece más posibilidades de interacción con el ARNm diana, aunque esto también puede favorecer la formación de interacciones no específicas y facilitar la formación de estructuras secundarias que interfieran en el proceso de hibridación.^{12, 38}



Los problemas que puede presentar la terapia antisentido son:

- a) Degradación del oligonucleótido *in vivo*.
- b) Captación ineficiente por parte de la célula.
- c) Unión no específica.
- d) Rotura del ARN no específica^{12, 38}



CAPÍTULO 2 APLICACIONES EN ENFERMEDADES CRÓNICAS

A lo largo de la historia de la medicina han existido diversos tipos de tratamientos para las enfermedades crónicas, enfermedades que, tienen un periodo de duración largo y por lo general de progresión lenta, cuyo periodo de curación no es exacto o incluso puede no llegar a ocurrir nunca. Dichos tratamientos son enfocados a disminuir la sintomatología de las enfermedades con fines de evitar complicaciones de las mismas, alargar el tiempo de vida o brindar una mejor calidad de vida al paciente.

Las enfermedades crónicas pueden tener una etiología meramente genética, es decir, enfermedades que son causadas por mutaciones en el material genético de un individuo, que pueden afectar desde un sólo gen (enfermedades monogénicas) e incluso cromosomas (anomalías cromosómicas). Las enfermedades crónicas pueden también tener una etiología multifactorial, es decir, que son producidas por múltiples factores ambientales y/o mutación en varios genes (enfermedades poligénicas) generalmente de diferentes cromosomas.

Las enfermedades crónicas pueden ser de carácter adquirido, es decir enfermedades que se desarrollan en el momento del nacimiento, en punto de o después, un ejemplo de enfermedades adquiridas son las infecciones.

La terapia génica se ha desarrollado como un método de acercamiento al tratamiento de las enfermedades crónicas basado en la transferencia de material genético a las células de un individuo. Habitualmente la finalidad de esta transferencia de material genético es restablecer una función celular que estaba abolida o defectuosa, introducir una nueva función o bien interferir con una función existente.



2.1 Hemofilia

Las hemofilias son un padecimiento hereditario común y distribuido por todo el mundo; se deben a la deficiencia o ausencia de los factores VIII (hemofilia A, hemofilia clásica, HA) o IX (hemofilia B, enfermedad de Christmas, HB) de la coagulación.

El gen que codifica el factor VIII (FVIII) se localiza al final del brazo largo del cromosoma X, en Xq28.1. Se han informado 6 mutaciones puntuales (mutaciones a nivel molecular que afectan la constitución química de los genes, es decir a las bases del DNA en un 65%), deleciones (28%) e inserciones (6%); casi 50% de los afectados de HA severa presentan una mutación compleja del tipo re-arreglo.

El gen del FIX se encuentra un poco más hacia el centrómero en Xq27.2, aunque existe una amplia gama de mutaciones, las más frecuentes son las puntuales.³⁹

Hasta ahora se han completado cinco pruebas clínicas de terapia génica para la hemofilia en las que participaron un total de 41 pacientes. Todos estos estudios han sido pruebas de fase I/II en las que el propósito principal ha sido evaluar la toxicidad potencial del tratamiento (fase I) y determinar si hay signos precoces de beneficio terapéutico (fase II). Debe señalarse que ningún paciente mostró evidencia alguna de desarrollo de inhibidores como respuesta a la transferencia de genes. Ninguno de los pacientes tratados en estas pruebas clínicas experimentó efectos adversos importantes de largo plazo, aunque dos personas tuvieron efectos secundarios transitorios relacionados con su tratamiento con vectores virales (tabla 1).⁴⁰

Vector/promotor (patrocinador del estudio)	Inserción/órgano principal	Sujetos (N)	Resultados	Complicaciones	Referencias
Hemofilia A:					
No viral/fibronectina con cADN de factor VIII desprovisto de dominio B (Transkaryotic Therapies)	implantación omental después de electroporación <i>ex vivo</i> , selección y crecimiento de fibroblastos autólogos cultivados	12	<ul style="list-style-type: none"> no hubo respuestas sostenidas posibles niveles de factor VIII transitorios, pero a nivel de detección en algunos, posible requisito de menores infusiones 	no hubo efectos adversos de importancia; se requiere biopsia de piel y cirugía laparoscópica con factor VIII	Roth et al, 2001
Retroviral/viral-LTR con cADN de factor VIII desprovisto de dominio B (Chiron)	3 dosis intravenosas diarias/hígado	13	<ul style="list-style-type: none"> no hubo respuestas sostenidas en algunos, posible supervivencia prolongada del factor VIII transfundido en algunos, posible requisito de menores infusiones 	no se observó ninguna	Powell et al, 2003
Adenoviral/albúmina con cADN de factor VIII de longitud completa (GenStar)	intravenosa/hígado	1	<ul style="list-style-type: none"> no hubo respuesta sostenida posibles niveles de factor VIII transitorios, pero a nivel de detección 	disfunción transitoria del hígado y trombocitopenia	White, 2003
Hemofilia B:					
Viral adenoasociado, VAA-2/CMV con cADN de factor IX e intrón parcial (Avigen)	intramuscular/múltiples inyecciones en el <i>vastus lateralis</i> de ambos lados	8	<ul style="list-style-type: none"> no hubo respuestas sostenidas vector y expresión persistentes, demostrada hasta por 10 meses en biopsias musculares 	no hubo eventos adversos de importancia; se administró factor IX para evitar hemorragia intramuscular	Manno et al, 2003
Viral adenoasociado, VAA-2/ alfa-antitripsina con cADN de factor IX (Avigen)	intrahepática mediante un catéter con oclusión momentánea mediante globo del flujo a la arteria hepática	7	<ul style="list-style-type: none"> no hubo respuestas sostenidas con la dosis más elevada, un paciente logró niveles transitorios de factor IX de 12% en algunos, posible requisito de menores infusiones 	disfunción transitoria del hígado en dos pacientes; se administró factor IX para evitar hemorragia durante procedimiento	High, 2004; High et al, 2004; Manno et al, 2006

Tabla 1 Pruebas clínicas de transferencia de genes para hemofilia A y B.





Las pruebas iniciales de terapia génica para la hemofilia en humanos no han mostrado efectos adversos persistentes, aunque, en el mejor de los casos, los incrementos en los niveles de factor de coagulación han sido mínimos y de corta duración. Parece probable que, para que se logren niveles terapéuticos de factor de coagulación a largo plazo en humanos, será necesario superar varios retos que todavía prevalecen, incluyendo prevención en el anfitrión de respuestas inmunes al vector y al producto transgen, mayor eficacia de transfección, así como desarrollo de estructuras de transgenes que mantengan una expresión persistente después de su administración. No obstante, a pesar de estos retos, todavía hay motivo de optimismo y el desarrollo de métodos seguros y eficaces para brindar una “cura” a la hemofilia sigue siendo factible.⁴⁰

2.2 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 resulta de una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas que lleva al déficit en la producción de insulina y al desarrollo de hiperglucemia.⁴¹

Aunque la diabetes tipo 1 es una enfermedad poligénica, los genes de la región HLA, y en especial los genes HLA de clase II (DQA1, DQB1 y DRB1) son los principales factores de susceptibilidad genética frente a la enfermedad. La región HLA se ubica en el brazo corto del cromosoma 6, en una región que abarca cerca de 4.000 Kbp y que contiene más de 200 genes, de los que el 40% se estima que están relacionados con la función inmune.⁴²

En la diabetes tipo 1, la terapia sustitutiva con insulina, a pesar de que permite a los pacientes llevar una vida activa, no es perfecta, debido a la dificultad para mantener la normoglucemia.⁴¹



Por ello, es necesario desarrollar terapias más efectivas que permitan mantener la normoglucemia. El diseño de nuevas terapias para la diabetes tipo 1 requiere en primer lugar avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de la enfermedad. Ello, junto con los avances en el campo de la terapia génica, contribuirá muy probablemente en un futuro a desarrollar aproximaciones que llevarán a la curación de la enfermedad.⁴¹

La terapia génica podría ser de utilidad en el tratamiento, la curación o la prevención de la diabetes. Las principales terapias que se han propuesto en este sentido son fundamentalmente de cuatro tipos:

- a) Terapia génica preventiva. En modelos animales, se han descrito un gran número de aproximaciones que tienen como objetivo reducir o eliminar la respuesta inmunitaria contra las células beta. Sin embargo, actualmente es difícil que estas aproximaciones se trasladen a la clínica, ya que no existen marcadores fiables para predecir qué individuos van a desarrollar diabetes tipo 1.
- b) Terapia génica curativa. Esta estrategia pretende regenerar la masa de células beta *in situ* en el páncreas del paciente y, a su vez, contrarrestar la respuesta autoinmunitaria. El objetivo es incrementar la replicación de las células beta remanentes, o bien inducir la formación de nuevas células beta (neogénesis), para regenerar los islotes que han sido destruidos y conseguir que las nuevas células beta estén protegidas frente al ataque inmune. Esta aproximación supone un gran reto para la medicina regenerativa y, en caso de éxito, representaría la curación de la enfermedad.
- c) Terapia génica sustitutiva. Diferentes aproximaciones pretenden contrarrestar la hiperglucemia diabética y mantener la



normoglucemia mediante el incremento de la captación de glucosa por los tejidos periféricos gracias a la expresión del gen de la insulina en tejidos extrapancreáticos. Otras aproximaciones están centradas en inducir un proceso de neogénesis de células beta en el hígado, mediante transferencia a este órgano de genes clave.

- d) Terapia génica para las complicaciones secundarias. El objetivo es contrarrestar o retrasar la retinopatía, la nefropatía o la neuropatía diabéticas. Estas aproximaciones representan un área de investigación muy activa y, aunque la mayoría de ellas son aún experimentales, existe ya algún ensayo clínico de terapia génica para la isquemia de las extremidades en pacientes diabéticos.

En la actualidad se han llevado a cabo diferentes pruebas de concepto que demuestran que es posible mejorar la glucemia de animales diabéticos mediante diversos protocolos de terapia génica. En este sentido, un elevado número de estudios se han centrado en la posibilidad de expresar insulina o derivados de la insulina en células no beta pancreáticas, como hepatocitos o fibras del músculo esquelético.^{41, 43}

Hasta 1983 toda la insulina utilizada para el tratamiento de la diabetes era extraída de páncreas de porcino y bovino, sin embargo, el uso prolongado de este tipo de insulinas provoca, en algunos individuos, una respuesta inmune. Actualmente gracias a la ingeniería genética se puede obtener insulina humana aislando el gen que codifica para la producción de la insulina e introduciéndolo en una bacteria genéticamente modificada (*E. coli*) para que esta sea capaz de producir dicha hormona.⁴⁴



2.3 Cáncer

El cáncer enfermedades en la que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos.

El cáncer es una enfermedad genética, es decir, es causado por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan las células, especialmente la forma como crecen y se dividen.

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes, proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Estos cambios se llaman a veces "causantes" de cáncer.⁴⁵

El concepto de terapia génica se origina de nuevos conocimientos en la biología molecular del cáncer y la compleja interacción entre las células tumorales y el sistema inmunitario. Estos conocimientos se utilizan para producir estrategias en el tratamiento del cáncer o la estimulación de la respuesta inmunitaria contra antígenos tumorales. Se han revisado múltiples avances terapéuticos y resultados de los ensayos clínicos de la terapia génica en el cáncer y no han sido satisfactorios; sin embargo, se siguen realizando esfuerzos para mejorar las fuentes de transferencia génica y los genes terapéuticos.

Se pueden distinguir tres tipos de enfoques de terapia génica contra el cáncer:

- a) Inmunoterapia. Se refiere a estimular al sistema inmune para el reconocimiento y la destrucción de células cancerígenas, Sin embargo, el éxito con la inmunoterapia convencional ha sido limitado, debido a que las células cancerígenas tienden a desarrollar mecanismos para



evadir la respuesta inmune. Una amplia gama de terapias génicas está siendo implementada para superar dicha limitación.

Actualmente se está utilizando terapia génica para crear vacunas contra el cáncer. A diferencia de las vacunas para agentes infecciosos, estas las vacunas no pretenden prevenir la enfermedad, sino curarla o contenerla a través del entrenamiento del sistema inmunitario del paciente para reconocer las células cancerígenas al presentarlas con antígenos celulares inmunoestimuladores.

Se han descrito tres vías para la aplicación de la inmunoterapia:

- Inmunoterapia con células cancerígenas alteradas: en esta técnica se obtienen células cancerígenas del paciente (autólogas) o de una línea de células cancerígenas establecidas (allogénicas) y se cultivan *in vitro*, estas son modificadas haciéndolas más susceptibles a la respuesta inmune agregándoles uno o más genes, que a menudo son genes de citocinas que producen moléculas proinflamatorias estimulantes del sistema inmune, después estas células modificadas son asesinadas y los productos restantes son incorporados en una vacuna.
- Inmunoterapia con genes *in vivo*: esta técnica consiste en la liberación de genes inmunoestimuladores, generalmente citosinas, directo al tumor, *in vivo*. Una vez dentro de las células cancerígenas estos genes producen proteínas para presentarlas al sistema inmune.
- Inmunoterapia con células inmunes alteradas: esta técnica consiste en modificar las células inmunes del paciente, una vez obtenidas las células, un antígeno tumoral u otro gen



estimulador les es añadido. Estas células alteradas son capaces de inducir una respuesta inmune hacia las células cancerígenas.

La tabla 2 proporciona una lista de los ensayos clínicos avanzados en este campo, incluida la fase, el tipo de la célula utilizada y el gen utilizado para crear una mejor respuesta. Estos ensayos fueron seleccionados para ilustrar el hecho de que hay amplios rangos de ensayos en diferentes etapas de eficacia utilizando una variedad de vectores para muchos tipos de cáncer.

- b) Agentes oncolíticos. En esta técnica se utilizan vectores. los cuales son generalmente virus que son genéticamente modificados para destruir las células cancerígenas. Estos vectores están diseñados para identificar e inducir la muerte de la célula por medio de la propagación de los virus, expresión de citosinas o lisis. Los vectores utilizados para esta técnica son los Ad, Rv y VHS-1.

La terapia adenoviral más destacable es la terapia viral ONYX-015 (un adenovirus genéticamente modificado, al cual le es removida la proteína E1B) sin esta proteína el virus es incapaz de replicarse en células que tienen un correcto funcionamiento del gen p53 (gen necesario para activar la apoptosis). En las células cancerígenas, al no tener un correcto funcionamiento del gen p53, el virus puede llevar a cabo su replicación e inducir la lisis celular. La terapia con ONYX-015 se encuentra en las etapas I y II en el tratamiento contra el carcinoma de células escamosas y en conjunción con la quimioterapia ha demostrado que tiene mejores propiedades antitumorales y lo cual le ha permitido concluir en una etapa III.

Cáncer	Genes estimulantes	Descripción	Fase
Próstata	Murina $\alpha(1, 3)$ galactosiltransferasa	Los glicoproteínas de ratón son expresados en células alogénicas de próstata para producir una respuesta de rechazo agudo.	II
Páncreas	CEA and MUC-1	Vacunas no recombinantes y el virus de la viruela aviar son manipulados para producir "CEA" Y muc-1 insertados subcutáneamente para generar una respuesta inmune al cáncer de páncreas.	III
Próstata	GM-CSF	Células de próstata alogénicas expresando el gen "GM-CSF" son utilizadas para inducir una respuesta inmune tras la quimioterapia y la infusión de células mononucleares en la sangre.	I/II
Linfoma	GM-CSF and CD40L	Células autólogas son combinadas con células alogénicas que expresan "GM-SCF" y "CD40L" e incorporadas en una vacuna con dosis bajas de IL-2	II
Melanoma	IL-2	Células autólogas de tumores son manipuladas para expresar IL-2 y son incorporadas en una vacuna.	II
Riñón	CD-80	Un adenovirus no recombinante modificado que contiene el antígeno CD-80 del tumor es inyectado subcutáneamente junto con la citosina IL-2 para producir una respuesta inmune al cáncer prostático.	II

Abreviaturas: CD-80, cytokine co-stimulatory molecule (Molécula co estimulante de citosina); CEA, carcinoembryonic antigen (antígeno carcinoembrionario); GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos); IL-2, Interleucina- 2; MUC-1, mucina 1.

Tabla 2 Ensayos clínicos de terapia génica mediante inmunoterapia.





El segundo tipo de viroterapia oncolítica sometida a ensayos clínicos utiliza el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1). Dos vectores, G207 y NV1020, se encuentran actualmente en ensayos de fase I y fase II para el tratamiento de cánceres intratables. Las mutaciones en varios genes de estos virus del herpes aseguran que se replican eficientemente solamente en células cancerosas. Estos vectores virales tienen dos mecanismos distintos de muerte celular. La porción lítica del ciclo de vida del virus mata directamente a las células y timidina quinasa que se expresa a partir de los genes víricos sensibiliza las células al ganciclovir (antiviral utilizado para el tratamiento de las infecciones causadas por citomegalovirus). Estos vectores de terapia viral se han utilizado con gran éxito *in vitro* y en animales modelo contra un gran número de cáncer sólido.

- c) Transferencia genética. Este método implica la introducción de un gen extraño en la célula cancerosa o el tejido circundante. Se han propuesto genes con una serie de funciones diferentes para este tipo de terapia, incluyendo genes suicidas (genes que causan la muerte celular cuando se expresan), genes antiangiogénesis y genes de estasis celular. En ensayos clínicos se han utilizado varios vectores virales diferentes para administrar estos genes, pero más comúnmente se han utilizado adenovirus.

Debido a que la tecnología de transferencia génica abarca un conjunto tan diverso de opciones terapéuticas, es imposible describir ejemplos para cada tratamiento. Sin embargo, una lista parcial de los tratamientos en los ensayos clínicos significativos actuales con una breve descripción de cada uno se presenta en la tabla 3.⁴⁶

Cáncer	Genes transferidos	Descripción	Fase
Páncreas	Rexin-G	Un constructor de ciclina citocida G1 se acumula preferencialmente en las células del tumor para bloquear la acción de ciclina G1 e iniciar la muerte celular.	I
Glioblastoma	VHStk	El gen "VHStk" se introduce en las células del glioblastoma por medio de un retrovirus de ratón. Estas células se vuelven vulnerables al medicamento ganciclovir que es administrado.	I
Cabeza y cuello	p53	La transferencia del gen p53 a un tumor por medio de un adenovirus no recombinante para inhibir la reproducción celular e inducir apoptosis.	III
Melanoma	MDA-7	MDA-7, una nueva molécula supresora de tumores, se introduce en las células del melanoma y la sobre expresión inhibe la proliferación celular e induce apoptosis.	II
Páncreas	TNF- α	El gen TNF- α bajo el control de un promotor inducible por radiación es introducido a las células del tumor y en combinación con la terapia radioactiva induce muerte celular.	II
Abreviaturas: VHStk, Virus de Herpes Simple timidina kinasa; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa.			

Tabla 3 Ensayos clínicos de terapia génica mediante transferencia de genes.





Por primera vez en Estados Unidos la FDA (*Food and Drug Administration*), el 30 de agosto de 2017 aprobó el primer protocolo de terapia génica, Kymriah, de la farmacéutica suiza Novartis, fue aprobada para ciertos pacientes pediátricos y jóvenes menores de 25 años con leucemia linfoblástica aguda (LLA), un cáncer de la médula ósea y de la sangre que, según la FDA es el cáncer infantil más común en Estados Unidos. Kymriah involucra insertar un gen en las propias células T para que éstas reconozcan y ataquen las células cancerosas.⁴⁷

2.4 VIH

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), producido por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ha adquirido características de pandemia y es motivo de preocupación mundial. La terapia anti-VIH está lejos de ser óptima, las actuales combinaciones de drogas anti-VIH retardan la progresión de la enfermedad y la aparición del SIDA, pero el efecto a largo plazo no es claro.

Además de las medidas de prevención, es necesario el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias terapéuticas para la infección por VIH. Nuevos enfoques biológicos para el tratamiento de la infección por VIH han sido propuestos, y entre ellos está el uso de la terapia génica. La infección por VIH puede ser considerada una enfermedad genética adquirida, pues el virus se integra dentro del genoma de la célula infectada, se replica con ella y tiene el potencial de expresarse hasta que la célula muere. El virus se transmite verticalmente de madre a hijos y la persona infectada se convierte en mosaico para los genes del VIH.

A falta de modelos animales satisfactorios las pruebas clínicas de la terapia génica del VIH se han llevado a cabo de manera *in vitro*, en células de donantes a las que se les transfecta un gen inhibidor de la replicación de



VIH que posteriormente son infectadas con el virus, la inhibición de la replicación viral y la sobrevivencia de los linfocitos son indicadores de la eficacia del gen transfectado, también se realiza la transfección de dichos genes en células hematopoyéticas para medir su eficacia en células diferenciadas.⁴⁸

Actualmente la terapia génica para el VIH consiste en modificar un gen *in vitro* de los linfocitos T CD4 que codifica para el receptor de superficie CCR5 (mayor correceptor para el VIH). Dicha modificación deja permanentemente disfuncional al gen que codifica el receptor CCR5, esta técnica se lleva a cabo por medio de las endonucleasas con dedos de zinc o ZFN (*Zinc-Finger Nucleases*). Pruebas clínicas han demostrado la efectividad de la terapia, haciendo a los linfocitos resistentes ante la infección por VIH y las cargas virales llegan a disminuir, incluso por debajo del límite de detección.⁴⁹

2.5 Insuficiencia cardiaca

La insuficiencia cardiaca (IC) se define como la incapacidad del corazón de bombear sangre de manera eficiente al organismo.

La insuficiencia cardiaca es una enfermedad crónica multifactorial, es decir que puede ser causada por diversos factores como lo son la cardiopatía isquémica, miocardiopatías causadas por otras enfermedades (hipertensión, diabetes, alcoholismo, VIH o miocardiopatía hipertrófica), arritmias, valvulopatías o por causas genéticas.

Se han realizado diversas pruebas clínicas para la terapia génica de la insuficiencia cardiaca:

- a) Los programas de liberación de genes SERCAa2. Estas son pruebas clínicas realizadas con VAA-1 con genes SERCAa2 que



actúan sobre la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico de las células miocárdicas (SERCA por sus siglas en inglés)

- b) Pruebas clínicas con SFD1. Estas pruebas son realizadas con el plásmido SFD1 inyectadas directamente en el endomiocardio
- c) Pruebas en realización y por realizarse. Entre estas se encuentran las pruebas con VAA-9 con genes S100A1, que ha tenido buenos resultados en animales y que posiblemente sea aplicable en un futuro en humanos. La modificación del VAA-2 (VAA2-i8) el cual posee alto tropismo cardíaco y la sobre-expresión del AC6 que está siendo actualmente probada y se esperan que los resultados estén disponibles pronto.

Las pruebas clínicas de la terapia génica para la insuficiencia cardíaca se presentan en la tabla 4.^{50, 51}

Prueba	Fase	Vector	Gen	Liberación	Pacientes objetivo	Número pacientes	Resultado primario	Ubicación del estudio	Estado
CUPID	I/II	AAV-1	SERCA2a	Intracoronaria	NYHA clase III/IV, LVEF $\leq 35\%$	Fase I: 12 Fase II: 39	Variable combinada a los 6 meses: NYHA, 6MWT, VO2 max, NT-proBNP, QOL, Función ecocardiográfica	EUA	Resultados publicados
	IIb	AAV-1	SERCA2a	Intracoronaria	NYHA clase II-IV, LVEF $\leq 35\%$	250	Tiempo para eventos cardiovasculares recurrentes (12 meses)	Internacional	Resultados publicados
SERCA- LVAD	II	AAV-1	SERCA2a	Intracoronaria	HF crónico pacientes en LVAD	24	Seguridad y Factibilidad	Reino Unido	No publicado
AGENT- HF	II	AAV-1	SERCA2a	Intracoronaria	NYHA clase III/IV, LVEF $\leq 35\%$	44	Cambios en el volumen sistólico ventricular izquierdo (6 meses)	Francia	No publicado
STOP- HF	I	Plásmido	SDF- 1	Endomiocardial	NYHA clase III, LVEF $\leq 40\%$	17	Eventos cardiacos adversos graves (30 días)	EUA	Resultados publicados
	II	Plásmido	SDF- 1	Endomiocardial	Cardiomiopatía Isquémica LVEF $\leq 40\%$	93	6MWT (4 meses)	EUA	Resultados publicados
RETRO-HF	I/II	Plásmido	SDF- 1	Retrógrada	Cardiomiopatía Isquémica, LVEF $\leq 40\%$	Fase I: 12 Fase II: 40	6MWT (4 meses)	EUA	Completado
AC6 Transferencia gen CHF	I/II	Adenovirus	H ac 6	Intracoronaria	HF crónico, LVEF $\leq 40\%$	56	Tiempo ejercicio combinado (i), (ii) Función cardiaca antes y durante la dobutamina	EUA	Completado

Abreviaturas. 6MWT, 6 min walk test; AAV, adeno-associated virus (virus adenoasociado); hAC6, human adenyl cyclase type 6 (adenil ciclasa humana tipo 6); HF, heart failure (insuficiencia cardiaca); LVEF, left ventricular ejection fraction (Bombeo fraccional del ventrículo izquierdo); LVAD, left ventricular assist device (dispositivo de soporte cardiaco); NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association (Asociación de Corazón de Nueva York); QOL, quality of life (Calidad de vida); SDF-1, stem cell-derived factor 1 (Factor 1 derivado de células madre); SERCA2a, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; VO2 max, maximal oxygen consumption (Consumo máximo de oxígeno).

Tabla 4 Ensayos clínicos de terapia génica para IC.



2.6 Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno neuromuscular severo que afecta a 1 de cada 3500 varones recién nacidos, causado por mutaciones en el gen DMD que codifica la distrofina. El gen responsable se encuentra en el brazo corto del cromosoma X en el locus Xp21. Como una enfermedad monogénica la distrofia muscular de Duchenne es considerada candidata para la terapia génica.

La terapia génica para la distrofia muscular de Duchenne está basada en la terapia antisentido mediante la técnica de salto de exón (*exon skipping*). En esta técnica no se modifica gen afectado, sino que, interfiere y modifica el proceso de transferencia de la información genética y de este modo las instrucciones para la producción de la distrofina, ignorando la información equivocada.

El salto de exón puede lograrse mediante oligonucleótidos antisentido (AONs por sus siglas en inglés), pequeñas piezas químicamente modificadas de siRNA o ADN, que se dirigen a exones específicos para ocultarlos de la maquinaria de empalme durante el proceso de traducción. Por lo tanto, se omite el exón, restaurando el marco de lectura abierto y permitiendo la producción de distrofinas de tipo distrofia muscular de Becker (DMB) (figura 20).⁵²

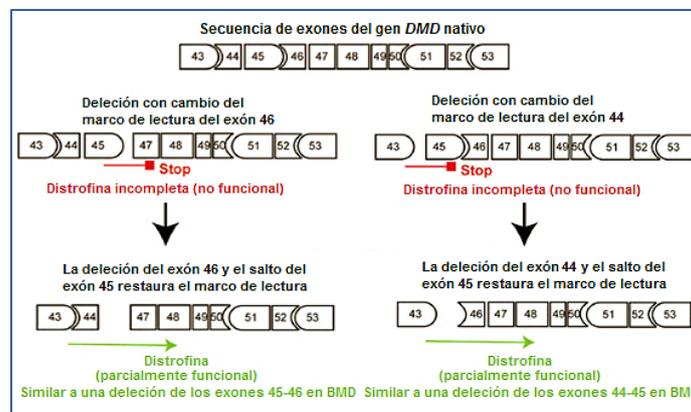


Figura 20 Salto del exón del gen de la DMD.



Los vectores de transferencia para la terapia génica de la DMD son los VAA. Actualmente se llevan a cabo o diversas pruebas clínicas de la terapia génica para la DMD, las cuales involucran la utilización de oligonucleótidos modificados: 2OMePS; GSK/Prosensa (2'-O-methyl phosphorothioate RNA) y PMO; AVI-Biopharma (phosphorodiamidate morpholino oligomers), los cuales se exponen en la tabla 5.⁵²

Pruebas clínicas con Eteplirsén un oligomero de morfolino fosforoamidato ha demostrado resultados positivos para la terapia antisentido con oligonucleótidos de la DMD.⁵³

Exón	Droga	Fase	Liberación	Dosis	Lugar	Estado
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	I	Intramuscular	0.8 mg Dosis única	Países bajos	Publicado
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	I/II	Subcutánea	0.5, 2, 4 y 6 mg/ kg 5 veces a la semana	Bélgica, Suecia	Publicado
51	AVI-4658 (PMO)	I/II	Intramuscular	0.09 y .9 mg dosis única	Reino Unido	Publicado
51	AVI-4658 (PMO)	I/II	Intravenosa	0.5, 1, 2, 4, 10 y 20 mg/ kg 12 veces a la semana	Reino Unido	Publicado
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	III	Subcutánea	6 mg/ kg a la semana	Bélgica, Suecia	En curso
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	II	Subcutánea	6 mg/ kg a la semana o dos veces por semana	Alemania, Australia, Bélgica, España, Francia, Países bajos, Reino Unido, Turquía	En curso
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	I	Subcutánea	3, 6, 9, 12 mg/ kg dosis única	EUA	En curso
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	III	Subcutánea	6 mg/ kg a la semana	Mundial	En curso
51	GSK2402968/ PRO051 (2OMePS)	II	Subcutánea	3 y 6 mg/ kg a la semana	EUA	En curso
51	AVI-4658 (PMO)	II	Intravenosa	30 y 50 mg/ kg a la semana	EUA	En curso
51	AVI-4658 (PMO)	II	Intravenosa	30 y 50 mg/ kg a la semana	EUA	En curso
44	PRO044 (2OMePS)	I/II	Subcutánea	0.5, 1, 1.5, 5, 8, 10 y 12 mg/ kg a la semana	Bélgica, Italia, Países bajos, Suecia	En curso

Tabla 5 Ensayos clínicos de terapia génica para DMD.





2.7 Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común y carece de terapias eficaces. Se han realizado ensayos clínicos de la terapia génica de Factor de crecimiento neuronal (NGF por sus siglas en inglés) en EA, el primer esfuerzo en la entrega de genes en un trastorno neurodegenerativo de adultos. Este programa tenía como objetivo determinar si un factor de crecimiento del sistema nervioso previene o reduce la degeneración neuronal colinérgica en pacientes con EA. Se presentaron hallazgos *post-mortem* en 10 sujetos con tiempos de supervivencia que van de 1 a 10 años después del tratamiento.

El objetivo del estudio era determinar si las neuronas degeneradas en la EA retienen una capacidad de responder a un factor de crecimiento del sistema nervioso entregado después del inicio de la enfermedad. 10 pacientes con EA temprana se sometieron a terapia génica con NGF utilizando ya sea técnicas *ex vivo* o *in vivo* para la transferencia de genes. Se examinaron los cerebros de los ocho pacientes en el primer ensayo *ex vivo* de fase 1 y dos pacientes en un ensayo *in vivo* de fase 1, el vector para el estudio fue VAA-2 con genes del NGF.

Las neuronas en degeneración en el cerebro con EA responden al NGF. Todos los pacientes presentaron una respuesta trófica al NGF, en forma de brotación axonal hacia la fuente de NGF. Comparando los lados tratados y no tratados del cerebro en tres pacientes que se sometieron a la transferencia de genes unilateral, la hipertrofia neuronal colinérgica se produjo en el lado tratado con NGF.⁵⁴



2.8 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad poligénica en la que el complejo CMH tiene una contribución importante. La presencia de un desequilibrio de citosinas en la articulación con AR ha sido bien descrita y ha servido como la piedra fundamental para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas que son independientes del halotipo CMH del paciente.

El objetivo de la citosina proinflamatoria TNF ha dado resultados clínicos impresionantes, en particular en combinación con metotrexato. Sin embargo, la producción de compuestos anti-TNF es extremadamente cara, la enfermedad reaparece al cesar la terapia y el 20% de los pacientes no responden. El mecanismo implicado en la falta de la respuesta al anti-TNF es todavía desconocida.

Los estudios clínicos iniciado por un grupo en Pittsburgh utilizando sinoviocitos autólogos que expresan constitutivamente IL-1Ra de un vector retroviral demostró que este método es seguro y factible. Si tal enfoque *ex vivo* utilizando estas células quiescentes conducirá en última instancia a un beneficio a largo plazo necesita una investigación adicional.

Los modelos animales siguen proporcionando diferentes vías posibles para el tratamiento. Sin embargo, tienen limitaciones, ya que muchos estudios son de corta duración (5-10 días) y no reflejan la naturaleza crónica a largo plazo de la enfermedad humana. Sin embargo, algunos estudios se han llevado a cabo durante unas semanas después de la aparición de la enfermedad en roedores, en xenotrasplantes de artritis utilizando sinoviocitos y cartílagos humanos, en animales grandes como caballos y en monos.

Una de las pruebas clínicas de terapia génica para la AR aprobada por la FDA es descrita en la figura 21.⁵⁵

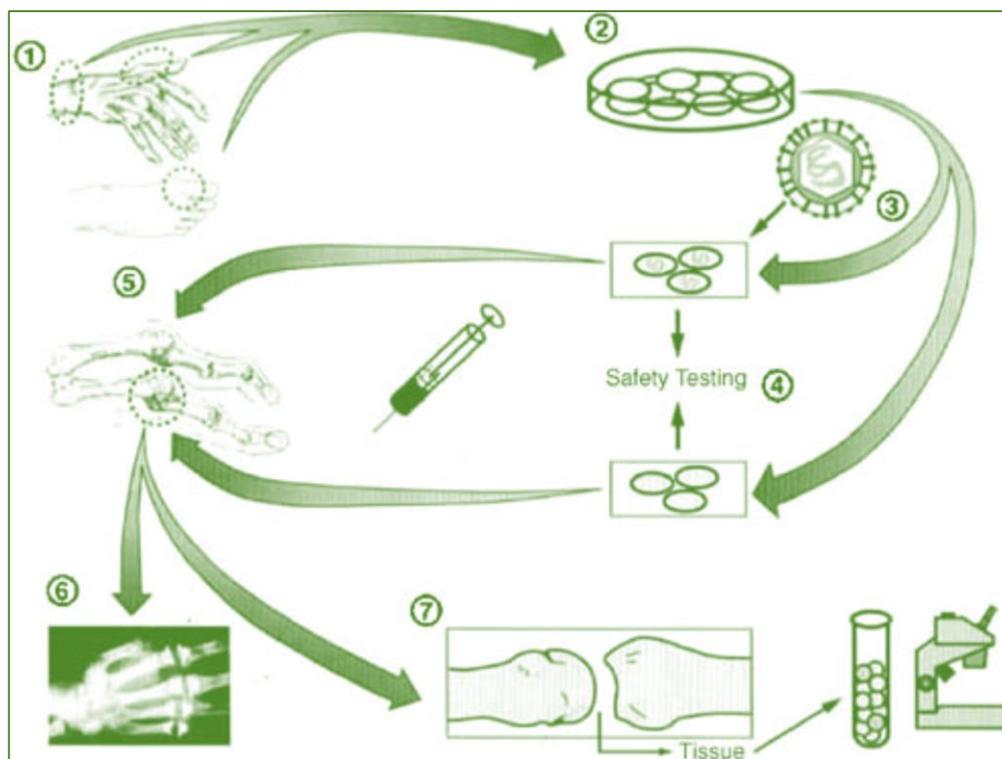


Figura 21 Esquema del ensayo clínico de terapia génica para la artritis. Aislamiento de células sinoviales (1). Los fibroblastos sinoviales se propagaron en cultivo (2) con la mitad de las células sometidas a infección con el vector retroviral MFG-IL-1Ra, mientras que la otra mitad de las células no fueron tratadas (3). Se prueban de las células para detectar la presencia de agentes tóxicos (4), las células se inyectaron de nuevo en las articulaciones metacarpofalángicas (MCP) 2 a 5(5).Una semana después de la inyección, las articulaciones fueron extirpadas quirúrgicamente (6) y el tejido analizado para la expresión y efectos fisiopatológicos del transgen IL-1Ra (7).



CAPÍTULO 3 TERAPIA GÉNICA EN ODONTOLOGÍA

Desde la introducción de la terapia génica para su aplicación en enfermedades bucodentales, se ha logrado un notable progreso en el campo de la terapia genética para una gama de aplicaciones en odontología. Con el fin de mejorar la calidad de vida, la terapia génica tiene resultados prometedores para el tratamiento potencial de múltiples trastornos genéticos. La terapia génica es una prometedora alternativa para la terapéutica en el campo de la odontología y actualmente se llevan a cabo ensayos clínicos para diversas aplicaciones en este campo las cuales se describen a continuación:

Dolor crónico. El dolor orofacial puede provenir de tejidos dentales duros (pulpitis, hipersensibilidad), tejidos blandos orales (articulación temporomandibular, glándulas, ortodoncia), tejidos neurológicos (neuralgia) y tejidos vasculares o psicogénicos. Convencionalmente, el manejo del dolor implica el uso de analgésicos y sedantes.

La producción y secreción continuas de proteínas antinociceptivas en o cerca de los cuernos dorsales espinales puede lograrse de dos maneras. En primer lugar, con Ad modificados, VAA o los plásmidos encapsulados en lípidos que codifican para la Interleucina-10 (IL10), una proteína terapéutica, que se puede inyectar en el espacio subaracnoideo para transducir las células de la piamadre.

En segundo lugar, un herpesvirus modificado puede ser introducido en los ganglios nerviosos de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés) a través de una inyección intradérmica a la piel. La razón para usar el virus del herpes es su tropismo hacia el tejido nervioso, y por lo tanto tiene la capacidad de viajar al DRG a través de las terminaciones nerviosas en la piel. En el DRG, se codifica un neurotransmisor inhibitorio, un péptido



antiinflamatorio o disminuye la síntesis de una molécula nociceptiva endógena que resulta en el alivio del dolor.

En la actualidad, el uso de terapia génica para el alivio del dolor se limita principalmente a modelos animales. Recientemente, se ha descrito una reducción en el dolor trigeminal través de un vector VHS-1 que codifica el gen de preproencefalina humana a en modelo de ratón.

La terapia génica puede ofrecer una solución al manejo del dolor en el tratamiento de los síndromes dolorosos como la neuralgia del trigémino y los trastornos de la articulación temporomandibular.⁵⁶

Vacunación. Durante muchos años, los odontólogos han intentado utilizar la tecnología clásica de vacunación para erradicar la caries dental o las enfermedades periodontales.

Muchos estudios han informado que la administración de ADN en liposomas y otros materiales aumentó la inmunidad de la mucosa. Se ha informado de que el plásmido pCIA-P que codifica el gen pac de *S. mutans* puede inducir respuestas inmunitarias anticaries protectoras en ratas mediante inmunización dirigida a las glándulas salivales.

Uno de los microorganismos que inician la enfermedad periodontal es *Porphyromonas gingivalis*. Dos genes de codificación de rgp (rgpA y rgpB) están localizados en el cromosoma de *P. gingivalis*. ; rgpA puede desempeñar un papel central en la patogénesis de la enfermedad periodontal a través de la producción de proteínas fisiopatológicamente significativas. Un estudio demostró que la inmunización de ratones con la vacuna de ADN con rgpA protege contra la infección de la cepa W50 invasiva de *P. gingivalis* en modelos de roedor.



Un estudio mostró que el suministro del ADNc para la proteína fimbrial de *P. gingivalis* en las glándulas salivales murinas condujo a la producción de una inmunoglobulina A secretada específica para esta proteína microbiana. Este enfoque podría utilizarse para inmunizar a los seres humanos contra otros microbios orales, tales como el *Streptococcus mutans*.⁵⁷

Carcinomas. El carcinoma de células escamosas de la región de cabeza y cuello (SCCHN por sus siglas en inglés) incluye el cáncer de la cavidad oral, los senos paranasales, la laringe, la faringe y la piel de la cabeza y el cuello. Es considerado el sexto cáncer más común en el mundo. Los trastornos genéticos se asocian comúnmente con tumores odontogénicos.

La terapia génica tiene el potencial de dar resultados de tratamiento emocionante y mejor pronóstico. Se ha visto que la tasa de respuesta es mayor en pacientes que reciben una combinación de terapia génica con otras modalidades de tratamiento convencionales.

En la actualidad, hay más de 1000 ensayos clínicos de terapia génica en curso en todo el mundo, de los cuales más de 700 se relacionan con cánceres, incluyendo 54 para SCCHN. Los vectores virales más frecuentes que se utilizan en este sentido son adenovirus y retrovirus.

Se han descrito diferentes tipos de estrategias para la terapia génica del cáncer las cuales se exponen en el capítulo 2.3.⁵⁶

Reparación ósea. A diferencia de otros tejidos dentales duros (como dentina de esmalte), los huesos pueden ser remodelados y tienen un buen potencial para regenerar y reparar. En muchos casos, las lesiones óseas y las fracturas cicatrizan sin formación de cicatrices. Sin embargo, en el caso de fracturas patológicas o defectos óseos masivos, la curación y la reparación ósea puede ser un reto.



Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, 4 y 7) son las únicas moléculas de señalización que pueden inducir por separado la formación ósea de *novo* en sitios ortotópicos y heterotópicos. El potencial osteoinductivo de las BMPs las hace clínicamente valiosas como alternativas a los injertos óseos. Con el fin de lograr la curación de los defectos óseos mandibulares, un estudio *in vivo* demostró la posibilidad de entregar los genes BMP-2 directamente a los tejidos a través de un vector adenoviral.

Además, en otra parte de la investigación *in vivo*, varios tipos celulares diferentes como fibroblastos (de encía humana y pulpa dental) y mioblastos, así como osteoblastos, pueden expresar el gen BMP-7 después de infectarse con un vector Ad. Estas células son capaces de diferenciarse en células formadoras de hueso cuando se colocan en un defecto óseo *in vivo*. Aunque las BMPs pueden causar osteoinducción individualmente, existe una fuerte evidencia de que estos factores trabajan en colaboración para inducir la formación ósea. Por ejemplo, la expresión coordinada de las BMP 2, 3a, 4, 7 y 8 durante la cicatrización de la fractura es importante tanto en el desarrollo del esqueleto como en la reparación.

Glándulas salivales. Las glándulas salivales secretan saliva que tiene un papel fisiológico para la lubricación, masticación y digestión de los alimentos. La falta de funciones de la glándula salival da lugar a sequedad de la boca (xerostomía). Los factores etiológicos comunes de la xerostomía incluyeron deterioro de las glándulas salivales, radioterapia de la cabeza y el cuello, trastornos autoinmunes (como el síndrome de Sjögren) y ciertos medicamentos.

Su capacidad para secretar proteínas en el torrente sanguíneo las convierte en sitios potencialmente útiles para la transferencia de genes de una manera mínimamente invasiva con la ayuda de la canulación intraductal.



Con el descubrimiento del gen de la acuaporina 1(AQ1), se prevé que los pacientes que sufren de salivación hipofuncional debido a la radiación ionizante puedan ser tratados mediante terapia génica. Estas radiaciones ionizantes causan un daño severo a la porción secretadora de líquido (células acinares) de la glándula salival que se encuentra en el campo de la radiación.

Recientemente, Lai *et al.* reportaron resultados positivos al usar la terapia génica con acuaporina para tratar los síntomas del síndrome de Sjögren en modelos animales. Aunque el concepto de terapia génica para las glándulas salivales se introdujo hace más de 20 años, el primer ensayo clínico en humanos se informó en 2012. Baum *et al.* informó resultados prometedores para el uso de ADNc de acuaporina-1 para el manejo de las hipofunciones salivales relacionadas con radiación durante la realización de ensayos clínicos.

Se requieren ensayos clínicos adicionales para decidir si la terapia génica es útil para llevar a cabo la estrategia de transferencia de genes AQP-1 clínicamente.⁵⁶

Movimientos ortodónticos. El movimiento del diente depende de la remodelación del hueso alveolar, que es controlada por osteoclastos y osteoblastos. Éstos tienen dos fuentes diferentes: Células estromales (osteoblastos) y células hemopoyéticas (osteoclastos). La formación de osteoclastos de resorción ósea maduros a partir de precursores hematopoyéticos requiere la interacción con células del linaje osteoblástico. Por lo tanto, se dice que las células del ligamento periodontal o las células osteoblásticas son necesarias para la osteoclastogénesis.

Dos estudios de Kanzaki *et al.* han utilizado la terapia génica con osteoprotegerina (OPG) y el activador del receptor del ligando NF-kappa B (RANKL) para acelerar e inhibir el movimiento de los dientes ortodónticos en un modelo de rata. La transferencia local de RANKL al tejido periodontal



aceleró el movimiento de los dientes ortodónticos en aproximadamente 150% después de 21 días, sin provocar ningún efecto sistémico. Los autores concluyeron que "la transferencia génica local RANKL podría ser una herramienta útil no sólo para acortar el tratamiento ortodóntico, sino también para mover los dientes anquilosados donde los dientes se fusionan con el hueso circundante". En contraste, la transferencia de genes OPG local inhibió el movimiento de los dientes en un 50% después de 21 días de aplicación forzada. Dentro de algunos años, procedimientos similares pueden ser utilizados por el ortodoncista para reducir el tiempo de tratamiento y mejorar los resultados.⁵⁸

Regeneración dental. La ingeniería de tejidos se ha desarrollado para la regeneración y reparación de tejidos, la investigación ha informado resultados prometedores para la ingeniería de tejidos de diversos tejidos orales y dentales.

La terapia génica *in vivo*, el potencial de curación de tejidos como el complejo dentino-pulpar, se ve reforzada por los genes que estimulan la formación de dentina después de ser aplicado directamente sobre la pulpa dental expuesta. Muchas personas tienen dientes supernumerarios que surgen del tercer conjunto de dentición. Esta tercera dentición también puede ser inducida a formar dientes de una manera natural activando o activando genes que codifican proteínas y moléculas de señalización que constituyen la estructura básica de los dientes.

La terapia génica *ex vivo* se basa en células madre dentales multipotentes que tienen el potencial de diferenciarse en cualquier tejido incluyendo tejidos dentales. Sus fuentes incluyen pulpa dental, papila apical, folículos dentales, dientes deciduos y ligamento periodontal. Las células madre modificadas genéticamente se cultivan y transfectan, y después, se vuelven a implantar de nuevo en el organismo. La regeneración exitosa del periodonto incluyendo el hueso alveolar y el cemento radicular se ha



logrado utilizando una combinación de células madre transfectadas por Ad para expresar el gen BMP-2.

Las células madre o progenitoras de la pulpa transfectadas también pueden diferenciarse en odontoblastos, que son luego trasplantados en la pulpa expuesta. De forma similar, se puede crear un germen dental *in vitro* con un cultivo de células madre epiteliales y mesenquimatosas. El germen dental se implanta en el hueso alveolar para convertirse en un implante de dientes totalmente funcional.

Los científicos están descubriendo las 20 proteínas básicas que son esenciales en el desarrollo de los dientes. La terapia génica ha demostrado para controlar la diferenciación de las células madre. Por ejemplo, la administración repetida de la terapia génica disminuye a medida que las células madre tienen la capacidad de renovarse.⁵⁶



CONCLUSIONES

Con el contenido teórico y los ensayos clínicos mencionados del presente trabajo monográfico podemos concluir que:

- La terapia génica es sin duda una potencial alternativa a futuro para el tratamiento de enfermedades crónicas de diferentes etiologías como lo son las enfermedades monogénicas, multifactoriales o inclusive adquiridas.
- Las estrategias de la aplicación de la terapia génica, *in vivo* y *ex vivo*, pueden realizarse de manera versátil gracias a las estrategias metodológicas utilizadas para la transfección génica.
- Existen diferentes métodos para la transferencia genética, los métodos no virales y virales. Los primeros presentan como ventajas generales su facilidad de manipulación, su estabilidad, baja inmunogenicidad y gran capacidad para transfectar genes.
- Los vectores virales son aquellos que se han obtenido a partir de un virus, eliminando sus características patológicas y adaptándolos para su función como transportadores de material genético, en general, los vectores virales presentan como ventaja su gran eficacia de transferencia y la posibilidad de integrar el transgén en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, arrastran importantes limitaciones que incluyen su falta de especificidad celular, la limitación del tamaño en el material genético a incorporar, su elevada inmunogenicidad y, sobre todo, el riesgo biológico que conllevan. Estos vectores fueron los primeros e utilizarse en la terapia génica y hasta el momento los más usados en ensayos clínicos.



- Con base a los estudios y a los múltiples ensayos realizados alrededor del mundo, un número considerable de enfermedades crónicas de etiología diversa podrían ser tratadas exitosamente con terapia génica.

- Actualmente el concepto de transfectar material genético exógeno e integrarlo específicamente al ADN *in vivo* del huésped para su corrección, estimulación o supresión es algo difícil de vislumbrar, pero los avances en la biotecnología y el conocimiento adquirido a través de los ensayos clínicos realizados hasta el momento, podrían hacer de la terapia génica una terapéutica fiable y segura para su realización en un futuro.

- Además de los ensayos clínicos *in vivo*, la terapia génica *ex vivo* es ahora aplicada exitosamente en diversas formas para tratar enfermedades crónicas, ya sea cultivando células y modificándolas genéticamente para su correcto funcionamiento y posterior reimplantación en el organismo donante, modificando agentes patógenos con el fin de estimular a las células del sistema inmunitario o la producción de agentes terapéuticos derivados de cultivos celulares modificados genéticamente para esta específica función.

- En el ámbito odontológico, la terapia génica aplicada clínicamente se encuentra presente en la reparación ósea por medio de proteínas morfogenéticas óseas. También se presentan avances en ensayos clínicos para diferentes utilidades en el campo de la odontología, mismos que, de llegar a demostrar fiabilidad y seguridad para su realización representarían un gran potencial como alternativa para el tratamiento de enfermedades bucodentales en un futuro.



Es deber del odontólogo y de cualquier profesionista del área de la salud, el conocimiento de distintos enfoques terapéuticos que permitan llevar a cabo un tratamiento efectivo y vanguardista, con la finalidad de brindar la mejor atención posible a las enfermedades de los pacientes.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez C. Bioética en ingeniería genética. Gaceta Médica de México. 2002; p. 109-119.
2. Klug W. S. Conceptos de genética. 10ma ed. Romo MM, editor. Madrid: Pearson Educación; 2013.
3. Parada L. V. Terapia génica el sueño y la realidad. ¿Cómo ves? Revista de divulgación de la ciencia de la UNAM. 2003 Marzo;(52).
4. Lisker R. Introducción a la genética humana México: Manual Moderno; 2013.
5. Nelson D. L. Principios de bioquímica. 5ta ed. Freeman WH, editor. Barcelona: Ediciones omega; 2009.
6. Karp G. Biología celular y molecular conceptos y experimentos. 7ma ed. Fraga J. L., editor. México,DF: McGrawHill; 2014.
7. Jiménez L. F. Biología celular y molecular. 1ra ed. Figueroa LG, editor. México, DF: Pearson; 2003.
8. [Online].; 2017[citado 2017 Septiembre 8]. Disponible en: <https://elmatraz.wikispaces.com/file/view/Alteraciones+gen%C3%A9ticas+humanas.pdf> .
9. Rozalen J. Aplicaciones de la terapia génica. Ambito Farmacéutico. 2003 Noviembre; 22(10).
10. Fernandez S. S. Avances y perspectivas de la medicina molecular. Gaceta médica de México. 2000 Septiembre-Octubre; 136(5).
11. Grupo enciclopedismo. Enciclopedismo. [Online].; 2017 [citado 2017 Septiembre 11]. Disponible en: <https://enciclopedismo.com/celuladiana/> .
12. Ronchera C. L. SEFH sociedad española de farmacia hospitalaria. [Online]. [Citado 2017 Septiembre 11. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf> .
13. Isamat M. Universitat de Barcelona. [Online]. [citado 2017 Septiembre 11]. Disponible en: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/melendez.pdf> .



14. Narvaiza I. Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología*. 2003 Abril-Junio; 22(2).
15. Toryk S. Aplicaciones de la terapia génica en genética médica. *medicina buenos aires*. 2000 octubre; 60(1).
16. Ávila S. Terapia génica. *Cuadernos de medicina reproductiva*. 2002; 8(2).
17. Herrera M. L. Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes revista especializada en ciencias de la salud*. 2012 Mayo; 15(1).
18. Talavera A. Nuevos sistemas virales en terapia génica. *Virologia*. 2004 enero; 10(1).
19. Wang D. *Discovery Medicine*. [Online].; 2014 [citado 2017 septiembre 12]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440413/>.
20. Fomiyana J. M. Vectores de transferencia en terapia génica. In Turró R, editor. *Curso de biotecnología aplicada*. Madrid: Grupo SANED; 2007. p. 119-155.
21. Rozalén J. Terapia génica. Vectores de expresión. *Ambito Farmacéutico*. 2003 Septiembre; 22(8).
22. Montes A. M. S. *Biología celular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. 1ra ed. Fraga J. L., editor. Ciudad de México: McGrawHill; 2013.
23. Artola J. M. I. Transfección de DNA a células de animales como herramientas utilizadas en la biotecnología animal. *The Biologist*. 2015 Enero; 13(1).
24. González M. ¿Cómo superar la membrana celular? *Revista salud animal*. 2007; 29(1).
25. Peñaranda A. A. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*. 2009 Enero; 3(5).
26. Shepard J. A. Gene Therapy Vectors with Enhanced Transfection Based on Hydrogels Modified with Affinity Peptides. *Biomaterials*. 2011 Agosto; 32(22).



27. Wieland J. A. Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Control Release*. 2007 Julio; 120(3).
28. Sheck R. M. Delivery and Protection of Adenoviruses Using Biocompatible Hydrogels for Localized Gene Therapy. *Molecular Therapy*. 2004 Enero; 9(1).
29. Russell W. C. Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*. 2000 Agosto; 81(11).
30. Danthinne X. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy*. 2000 Octubre; 7(20).
31. Wold W. S. M. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*. 2013 Diciembre; 13(6).
32. Coronas Serna J. M. Vectores Virales en Terapia Génica (Trabajo fin de grado) Serna JMC, editor. Madrid: Universidad Complutense; 2015.
33. Yu J. H. Advanced targeting strategies for murine retroviral and adeno-associated viral Vectors. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 2005; 99(1).
34. Kingsman A. J. [espatentes.com](http://www.espatentes.com). [Online].; 2001 [citado 2017 Septiembre 25]. Disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2153654_t3.pdf.
35. Giles M. S. The herpesvirus saimiri ORF 73 regulatory region provides long-term transgene expression in human carcinoma cell lines. *Cancer Gene Therapy*. 2003 Enero; 10(1).
36. Monastre R. A. Virus y Terapia Génica. *Virología*. 2013 Diciembre; 16(3).
37. Enríquez M. M. Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica. *Revista de Investigación Clínica*. 2012 Septiembre-Octubre ; 64(5).
38. Vera Lastra. Terapia Génica. *Medicina Interna de México*. 2008 Septiembre-Octubre; 22(5).
39. Bermeo S. M. Hemofilia: diagnóstico molecular y alternativas de tratamiento. *Colombia Médica*. 2007 Julio-Septiembre; 38(3).
40. Lillicrap D. Terapia génica para las hemofilias. *Tratamiento de la hemofilia*. 2008 Abril; 18(3).



41. Ayuso E. Aproximaciones de la terapia génica para diabetes tipo 1. *Avances en Diabetología*. 2010 Enero-Febrero; 26(1).
42. Salas P. F. Genética de la diabetes mellitus tipo 1. *Revista chilena de endocrinología*. 2013 Noviembre; 6(1).
43. Zorzano A. Terapia génica en endocrinología: una aproximación realista. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2003 Junio; 50(6).
44. Flores B. Producción de insulina humana por técnicas de ADN recombinante. *Ciencias*. 1994 Abril-Junio; 34.
45. Instituto Nacional del Cáncer. [Online].; 2015 [citado 2017 Octubre 4]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
46. Cross D. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *CM&R*. 2006 Septiembre; 4(3).
47. FDA. [Online].; 2017 [Citado 2017 Octubre 4]. Available from: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/ComunicadosdePrensa/ucm574222.htm>.
48. Chinen J. Terapia génica para la infección por VIH. *Revista Médica Herediana*. 1997 Abril-Junio; 8(2).
49. Tebas P. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine*. 2014 Marzo; 370(10).
50. Reyes Juárez J. L. Terapia génica en la Insuficiencia Cardíaca. *Archivos de Cardiología de México*. 2009 Abril-Junio; 72(2).
51. Hulot S. Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *European Heart Journal*. 2016 Junio; 37(21).
52. Verhaart I. E. C. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Current Opinion Neurology*. 2012 Octubre; 25(5).
53. Mendell J. R. Eteplirsen for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *American Neurological Association*. 2013 Noviembre; 74(5).
54. Tuszynski M. H. Nerve Growth Factor Gene Therapy Activates Neuronal Responses in Alzheimer's Disease. *JAMA Neurology*. 2015 Octubre; 72(10).



-
55. Robins P. D. Gene Therapy for Arthritis. *Gene therapy*. 2003 Mayo; 10(10).
56. Siddique N. Gene Therapy: A Paradigm Shift in Dentistry. *Genes*. 2016 Noviembre; 98(7).
57. Prabhakar A. R. Gene Therapy and its Implications in Dentistry. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2011 Mayo-Agosto; 4(2).
58. Mutacion en la evolución. [Online].; 2011 [citado 2017 Septiembre 25]. Disponible en: <http://mutacionenlaevolucion.blogspot.mx/2011/05/mutaciones-cromosomicas.html>.