

Transferencia de genes

Bases y aplicaciones

Luz Marina Restrepo, Luis Fernando García

En la última década el enorme desarrollo de la biología molecular ha posibilitado que la tecnología del DNA recombinante se aplique a la transferencia de genes con fines terapéuticos, pasando del sueño a la realidad.

Los sistemas de vectorización de los diferentes genes incluyen, a los retrovirus, adenovirus, herpes virus, liposomas, etc., cada uno con ventajas y desventajas, de acuerdo con la enfermedad a ser tratada y con el tejido objeto de la corrección genética. Hasta el momento aproximadamente 80 protocolos clínicos están siendo aplicados en el mundo y su número aumenta día a día. El control y regulación de la aplicación de estos protocolos implica la evaluación rigurosa de cada uno de ellos, tanto en modelos *in vitro* como en animales, antes de su aplicación final en el hombre. El país debe prepararse tanto científica y tecnológicamente como desde el punto de vista ético y legal, para enfrentar los retos de este nuevo enfoque terapéutico.

Introducción

La terapia génica como una modalidad de tratamiento para diferentes enfermedades humanas se ha desplazado, en pocos años, del plano teórico al práctico. Más de 35 protocolos clínicos han sido aprobados por el RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) y más de 80 pacientes han recibido terapia de transferencia de genes sin reacciones adversas hasta el momento (1).

Cuando se habla de terapia génica es necesario reconocer que su desarrollo y avance no habrían sido posibles sin que se dieran en el campo de la investigación en biología molecular y en genética. Si nos situamos algunas décadas atrás nos encontramos frente a problemas de identificación, clonación y amplificación de genes. Fue necesario descubrir que en microorganismos como *E. coli* existían moléculas circulares de DNA (vectores naturales o plásmidos), independientes del cromosoma bacteriano, que podían ser aislados de los mismos, que poseen secuencias reconocidas por las enzimas de restricción, lo cual puede ser utilizado para adicionar secuencias de DNA y producir moléculas híbridas o recombinantes. Dichas moléculas recombinantes pueden utilizarse para transformar bacterias de tal manera que su maquinaria sintética, una vez transformadas,

es aprovechada para amplificar el gen o la secuencia insertada, ya que estos plásmidos se replican con el material genético bacteriano. Muchos de los plásmidos que se utilizan corrientemente en biología molecular, son construidos en el laboratorio, adicionándoles secuencias que les confieren una ventaja selectiva, como por ejemplo la resistencia a drogas, como la ampicilina o la tetraciclina, lo cual permite identificar fácilmente las colonias de las bacterias que contienen la molécula recombinante (2).

Actualmente son muchas las proteínas y las secuencias génicas que se producen por tecnología de DNA recombinante, entre otras la hormona del crecimiento, la insulina, el interferón, etc. Como vemos, la carpintería genética dejó de ser un monopolio de las células vivas, pues desde hace algún tiempo los investigadores hacen otro tanto: cortan y pegan el DNA tan fácilmente como se pega una película. Estos cortes y uniones se realizan gracias a una bacteria de enzimas que enrollan, transcriben, reprimen, replican y ligan el DNA de mil maneras para dar origen a lo que se conoce como "construcción", es decir, una molécula de DNA recombinante.

Dra. Luz Marina Restrepo: Laboratoire de Transfert Génétique et Oncologie Moléculaire, Hôpital Saint Louis, Paris, Francia; Dr. Luis Fernando García: Laboratorio Central de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

en la que se incluyen secuencias génicas plasmídicas, virales, bacterianas o eucarióticas con secuencias de regulación y expresión determinados por su utilización posterior.

Hasta hace algunos años los logros en ingeniería genética estaban restringidos a organismos simples como los virus, las bacterias o las levaduras, pero actualmente nos acercamos a pasos agigantados al ser humano. No se puede, sin embargo, experimentar sobre el hombre como se experimenta sobre las bacterias o sobre otros animales. La experimentación en humanos genera controversias, el éxito de la tecnología de DNA recombinante suscita grandes esperanzas, pero es indudable que hay que aprender a controlar el poder creciente de la ingeniería genética, que ofrece (¿o amenaza?) transformar la naturaleza misma de la humanidad (2). Ya la terapia génica, o lo que es lo mismo la utilización del DNA como medicamento, es una realidad inminente. Es así como en este momento varios protocolos clínicos están siendo aplicados en el hombre. En este artículo trataremos de revisar cuáles fueron los avances tecnológicos que nos permitieron llegar al estado actual de la terapia génica. Igualmente veremos cuáles son las perspectivas, implicaciones éticas y sociales y el futuro de esta nueva herramienta terapéutica.

Conceptos básicos

Durante algún tiempo se pensó que la terapia génica era la introducción de material genético en las células somáticas con el fin de tratar enfermedades malignas, infecciosas o errores congénitos del metabolismo (3). Sin

embargo, existe también la posibilidad de inactivar (recombinación homologa) o destruir genes mutados ("knock out") para corregir una enfermedad (4). De ahí que podríamos considerar la terapia génica como el conjunto de tecnologías que permiten adicionar, reemplazar o eliminar material genético en las células somáticas de un individuo con el fin de corregir el funcionamiento anormal de un gen. En algunas enfermedades la introducción de un homólogo funcional del gen defectuoso y la elaboración, aún en pequeñas cantidades, del producto génico ausente, tienen efecto benéfico. Al mismo tiempo, en estos casos la superproducción no tiene efectos deletéreos. Los desórdenes genéticos son candidatos ideales para terapia génica ya que la expresión del gen transcrito no tiene que ser estrictamente regulada. Otras enfermedades requieren que una cantidad específica del producto génico sea elaborada en un tiempo determinado. En tal caso el gen transcrito debe ser colocado bajo controles reguladores apropiados, lo cual puede lograrse por terapia de reemplazo en oposición a una de adición como es la práctica corriente. Sin embargo, no siempre es necesario corregir la lesión en el tipo de célula que presenta el defecto, y en algunos casos el gen terapéutico puede ser introducido dentro de otro tipo celular de tal forma que las células genéticamente modificadas reemplacen funcionalmente a las que tienen la deficiencia (5). Es la enfermedad entonces la que determina el tipo de terapia y el sistema de vectorización a utilizar. Varios requisitos son comunes a

todas las enfermedades susceptibles de ser tratadas por terapia génica:

1. La patogénesis de la enfermedad debe ser conocida a nivel molecular e involucrar un solo gen.
2. Las secuencias correspondientes de DNA deben estar clonadas y disponibles.
3. Se deben establecer métodos efectivos de liberación del gen.
4. Las secuencias reguladoras que llevan a una expresión apropiada del gen transferido deben ser conocidas.
5. Dado el costo de esta aproximación terapéutica sería razonable limitar su aplicación a enfermedades en las cuales no exista otra posibilidad terapéutica (6).

Sistemas de vectorización

Una vez conocidos los mecanismos moleculares y patogénicos de una enfermedad, se pueden considerar dos enfoques terapéuticos fundamentales: 1) farmacológicos, en los cuales se pueden adicionar drogas específicas basadas en las características funcionales del producto del gen defectuoso o 2) genéticos, basados en la inserción de transgenes introducidos en las células donde la anomalía es expresada, con miras a sustituir el gen endógeno por la introducción de uno normal, aunque algunas veces esta sustitución se hace en células diferentes a las directamente afectadas. Podemos decir entonces que un transgen es una secuencia particular de DNA liberada en el núcleo de una célula en la cual puede ser establemente integrado en el DNA genómico y potencialmente transmitido a las células des-

cendientes. Se denomina vector a una molécula de DNA recombinante que incluye DNA viral, secuencias plasmídicas, el gen o genes de interés o bien vesículas lipídicas portadoras de las secuencias de DNA de interés. El medio o forma en la cual el transgen es introducido o liberado en una célula se denomina sistema de vectorización. Como mencionamos antes existen vectores naturales como los plásmidos, que permiten la introducción y amplificación de secuencias génicas en microorganismos. Sin embargo, la situación es diferente cuando se trata de introducir un material genético en células eucarióticas. La terapia génica se basa en el desarrollo de vectores especiales, en muchos casos aprovechando el material genético de algunos virus y su tropismo natural por ciertos tipos de células, para construir moléculas híbridas con capacidad para penetrar, y a veces integrarse en el material genético de las células eucarióticas, en cuyo caso se logra una expresión por largo tiempo del gen, o genes de interés, lográndose una transducción por largo término; en el caso contrario se obtiene una expresión temporal de las secuencias insertadas, lo cual se conoce como transducción transitoria (7).

El beneficio esperado de las modificaciones genéticas sobre las células somáticas se debe determinar cuidadosamente y analizar sus riesgos potenciales. No importa cuál sea la estrategia tecnológica utilizada, el sistema de liberación (vector) no debe ser propagado ni transmitido a otros órganos o tejidos diferentes al "blanco" inicial (8). La Tabla 1 muestra los sistemas de

vectorización y liberación de genes actualmente en uso.

Vectores retrovirales

Se trata de virus RNA, los cuales una vez infectan una célula el RNA es transcrito a DNA, que a su vez se integra en el DNA genómico de la célula infectada. Esta forma integrada se denomina provirus (Figura 1).

La mayoría de los vectores retrovirales se derivan de retrovirus murinos o de aves. El más comúnmente utilizado es el virus de Moloney de la leucemia murina (Mo-MuLV). La biología de este retrovirus es relativamente bien conocida y los sistemas basados en él producen virus recombinantes con títulos más o menos altos. Además se dispone de variantes que infectan eficazmente células humanas (5).

Los vectores retrovirales tienen generalmente dos componentes:

a. Una molécula retroviral recombinante, en la cual los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, que codifican respectivamente para las proteínas de la capsida, la DNA polimerasa y las glicoproteínas de la envoltura que son insertadas en la membrana de la célula huésped, son reemplazadas por los genes de interés: un gen marcador que confiere resistencia a una droga (generalmente neomicina o higromicina) y un gen terapéutico como por ejemplo IL-2, ADA, B7, LDL, alfa-1-antitripsina, etc. Estos dos genes pueden ser expresados a partir del mismo promotor retroviral. Como el tamaño del gen a ser vectorizado por un retrovirus es bastante limitado, se hace necesaria la remoción de secuencias codificadas por el virus, pero el vector sin estas secuencias estructurales es incapaz de "encapsi-

Sistema	Aplicación en terapia génica		Expresión
	Ex vivo	In vivo	Estable (E) Transitoria (T)
Virales			
Retrovirus	+	?	E
Adenovirus	+/-	+	T
Virus asociados a adenovirus (AAV)	+	?	E
Virus herpes	+/-	+	?
Virus vaccinia	+/-	+	T
Virus polio	+/-	+	T
Sindbis y otros virus RNA	+/-	+	T
No virales			
Conjugados			
Ligando-DNA	-	+	T
Lipofección	+/-	+	T
Electroporación	+	-	T
Coprecipitación	+	-	E
Ca ₂ PO ₄			
Modificado de ref 7			

Tabla 1. Sistema de liberación de genes en células de mamíferos.

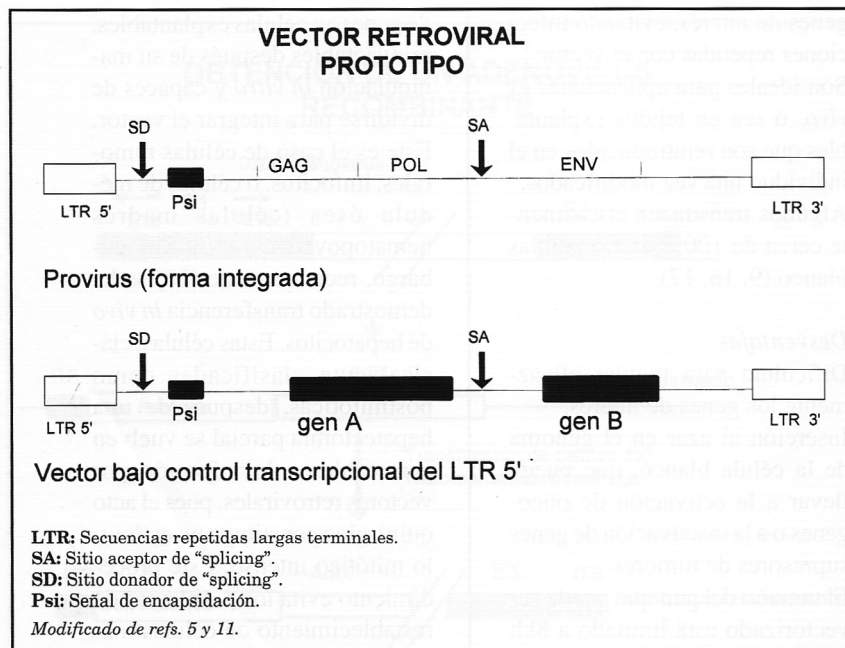


Figura 1. En un vector retroviral, los genes A y B reemplazan las secuencias gag, pol, y env, (proteínas de capsida, DNA polimerasa y proteínas de envoltura respectivamente) pero permanecen bajo el control transcripcional de LTR5'.

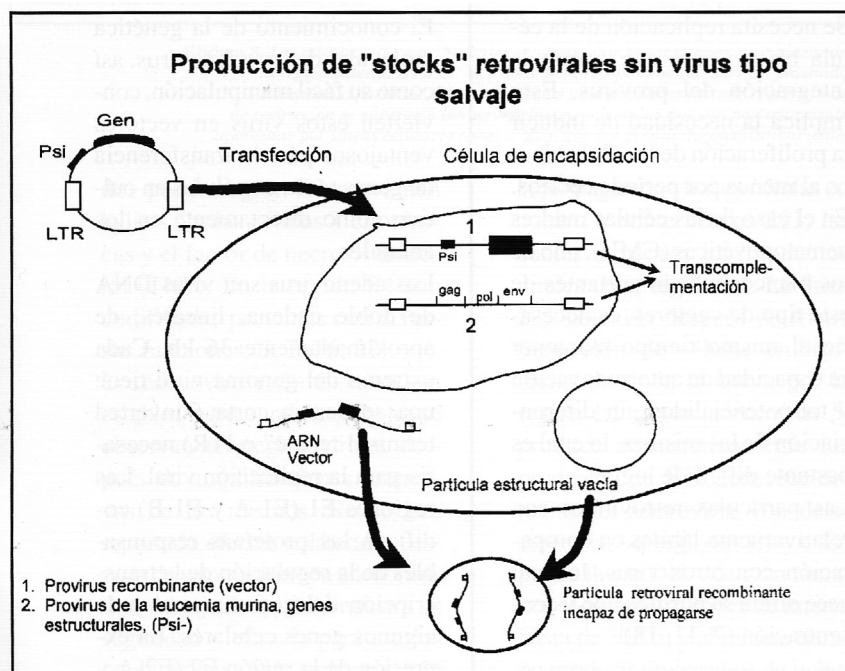


Figura 2. Un vector retroviral Psi+ es encapsidado en la partícula viral producida por el provirus Psi-, integrado en la línea de encapsidación. Las partículas virales liberadas en el medio de cultivo son usadas posteriormente para infectar una célula blanco. Dichas partículas se integran en el genoma de la célula blanco y el ciclo de infección se detiene allí, pues son incapaces de replicarse.

Modificado de refs. 5, 11 y 13.

darse" para iniciar un nuevo ciclo de infección. Así, la mayoría de los vectores retrovirales disponibles son por definición defectuosos o incompetentes para su replicación (9-12).

b. Uno de los avances más importantes en el desarrollo de los retrovirus como vectores de transfección fue la generación de líneas celulares especializadas ("packaging cells"), que permiten la producción de virus recombinantes defectuosos con altos títulos de infección y libres de virus tipo salvaje. En principio, como las líneas de empaquetamiento no transmiten información genética para la producción de virus, las células blanco transducidas son incapaces de perpetuar una infección y esparcir el virus a otras células. Por lo tanto, se utilizan líneas de empaquetamiento que aportan, por transcomplementación, las proteínas retrovirales estructurales. Por ejemplo, en el genoma de fibroblastos 3T3 se ha introducido por transfección un provirus de Mo-MuLV desprovisto de la señal de encapsidación Psi. Este provirus es capaz de dirigir la síntesis del conjunto de constituyentes del virus, pero el RNA genómico sin secuencias Psi (Psi-) no puede ser encapsidado eficazmente. Cuando se introduce en estas células un vector retroviral Psi+, se produce entonces una transcomplementación: el vector recombinante Psi+ se encapsida dentro de la partícula viral producida por el provirus Psi-. Se producen entonces "stocks" de retrovirus recombinantes sin virus tipo salvaje. Recientemente las características de las líneas de empaquetamiento han sido mejoradas por la introducción de

modificaciones suplementarias que disminuyen el riesgo de formación de virus salvaje por recombinación con el vector retroviral. Se dispone entonces de líneas de encapsidación confiables y seguras para producir "stocks" de vectores retrovirales libres de virus salvaje, ya sea ecotrópicos (específicos de células murinas) o anfotrópicos (con tropismo más extendido, incluyendo células humanas) (13-15) (Figura 2).

Ventajas

Los vectores retrovirales normalmente son capaces de infectar un amplio rango de células.

Las construcciones pueden dirigirse de tal forma que los vectores sean ecotrópicos o anfotrópicos. Algunas estrategias para la modificación del espectro de infección de una construcción retroviral implican, por ejemplo, la utilización de anticuerpos dirigidos contra una proteína de la superficie de la célula blanco. Igualmente las proteínas de *env* pueden ser químicamente modificadas de manera que sean reconocidas por receptores expresados en la célula blanco o rediseñarse el gen *env* del vector y reemplazar segmentos del mismo con epítopes que reconocen otros receptores diferentes a los usados normalmente por el virus; o bien, a través de ligandos específicos co-expresados junto con las proteínas *env* en la superficie del virus; de esta forma el receptor para el ligando es expresado en la célula blanco y el vector y la célula pueden interactuar.

Se integran en el genoma de la célula blanco, lo cual permite una expresión prolongada del gen o

genes de interés, evitando infecciones repetidas con el vector. Son ideales para aplicaciones *ex vivo*, o sea en tejidos explantables que son reintroducidos en el individuo una vez modificados. Algunos transducen eficazmente cerca de 100% de las células blanco (9, 16, 17).

Desventajas

Dificultad para regular eficazmente los genes de interés.

Inserción al azar en el genoma de la célula blanco, que puede llevar a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores.

El tamaño del gen que puede ser vectorizado está limitado a 8kb en promedio. La mayoría de los receptores retrovirales son desconocidos, lo cual hace difícil determinar su distribución en los diferentes tipos celulares.

Se necesita replicación de la célula blanco para que ocurra la integración del provirus. Esto implica la necesidad de inducir la proliferación de la célula blanco al menos por períodos cortos. En el caso de las células madres hematopoyéticas (CMH), uno de los blancos más importantes de este tipo de vectores, es necesario al mismo tiempo mantener su capacidad de autorrenovación y totipotencialidad sin diferenciación de las mismas, lo cual es bastante difícil de lograr.

Las partículas retrovirales son relativamente lábiles en comparación con otros virus, lo cual hace difícil su purificación y concentración (7, 11, 18).

Células blanco susceptibles a la infección por vectores retrovirales

Los vectores retrovirales son compatibles con la transferencia

de genes en células explantables, reinyectables después de su manipulación *in vitro* y capaces de dividirse para integrar el vector. Este es el caso de células tumorales, linfocitos, o células de médula ósea (células madres hematopoyéticas) (19). Sin embargo, recientemente (20) se ha demostrado transferencia *in vivo* de hepatocitos. Estas células, clásicamente clasificadas como postmitóticas, después de una hepatectomía parcial se vuelven permeables a la infección por vectores retrovirales, pues el acto quirúrgico constituye un estímulo mitótico intenso. Este procedimiento evita los problemas de restablecimiento de células manipuladas en un órgano y ofrece una alternativa potencial al trasplante de hígado (21).

Vectores adenovirales

El conocimiento de la genética molecular de los adenovirus, así como su fácil manipulación, convierten estos virus en vectores ventajosos para la transferencia de genes tanto en células en cultivo como directamente en los animales.

Los adenovirus son virus DNA de doble cadena, lineares, de aproximadamente 36 kb. Cada extremo del genoma viral tiene una secuencia corta ("inverted terminal repeat" o ITR) necesaria para la replicación viral. Las regiones EI (EI-A y EI-B) codifican las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y de algunos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2-A y E2-B) está involucrada en las funciones virales replicativas (proteínas de unión del DNA, DNA polimerasa y proteína terminal). Los productos codifica-

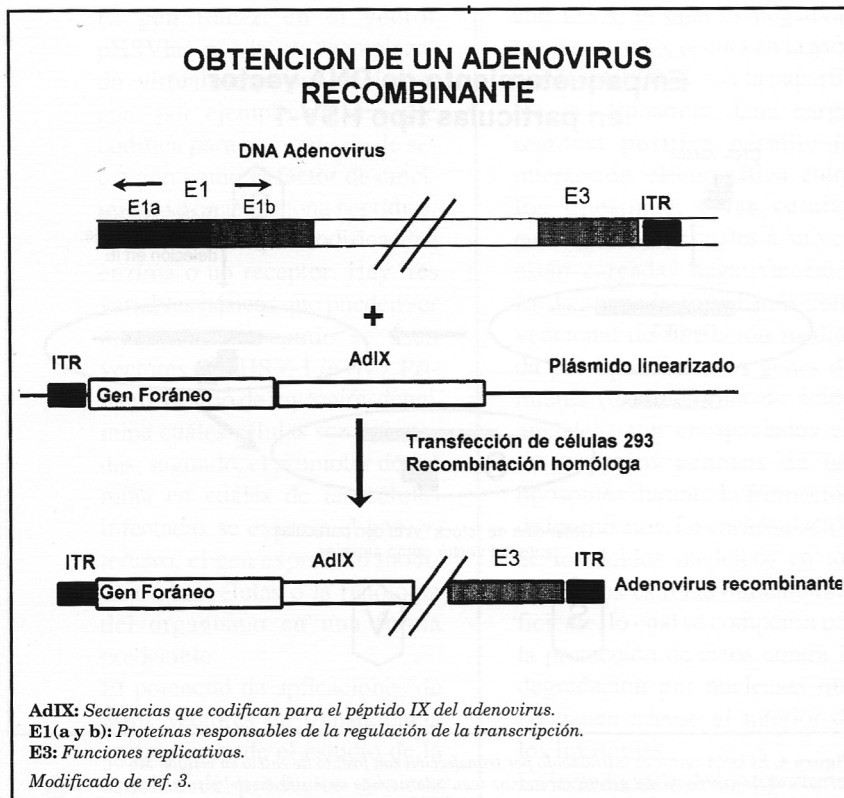


Figura 3. Los adenovirus recombinantes generalmente se construyen reemplazando la región interna E1 o E3. A través de la recombinación entre un plásmido linealizado portador del gen foráneo y un adenovirus cortado con enzimas de restricción se suprimen las secuencias mencionadas que son posteriormente aportadas por líneas celulares como la 293, que las producen constitutivamente.

dos por la región E3 previenen la lisis por las células T citotóxicas y el factor de necrosis tumoral (TNF). En la región E4 son codificadas proteínas con diversas funciones (3, 7, 16, 22). Los adenovirus recombinantes son estables estructuralmente y no se observan rearrreglos virales después de amplificaciones extensivas de los mismos. No se han reportado efectos colaterales después de vacunación con adenovirus tipo salvaje, lo cual demuestra su seguridad y eficacia para usarlos en humanos. Sin embargo, aún existen problemas por resolver con las construcciones disponibles. La vectorización de secuencias de DNA en los adenovirus utiliza la disponibilidad de la región E3 para

la propagación viral en células en cultivo y sobre células 293, las cuales expresan los productos virales de la región E1. La línea 293 obtenida después de transformación de células embrionarias de riñón humano, por la región E1 de un adenovirus 5, produce constitutivamente los productos de E1. Consecuentemente un adenovirus con deleciones en las regiones E1 y/o E3 puede llevar DNA de gran tamaño (secuencias o genes de interés hasta de 30Kb) y al mismo tiempo producir títulos altos de infección en células como las 293. Así la mayoría de los vectores adenovirales en uso, tienen deleciones en estas regiones y la expresión de las secuencias in-

sertadas está normalmente dirigida por el promotor E1A, el promotor principal tardío (MLP-"Major late promoter"), el promotor E3 o por secuencias de promotores adicionales exógenamente (Figura 3).

Se ha logrado la transducción eficiente de un número importante de células *in vivo* e igualmente la expresión prolongada de los genes transducidos, sugiriendo que los vectores adenovirales existentes son parcialmente competentes para su replicación, lo cual tendría problemas de seguridad ya que el ciclo de vida de los adenovirus implica expresión temporal de un gran número de productos génicos con actividades biológicas diversas. Además de la expresión de genes que llevan a la inactivación de la síntesis de proteínas del hospedero, algunos productos génicos involucrados en la transformación maligna también son expresados y por lo menos una proteína estructural expresada tardíamente en la replicación es específicamente tóxica para las células (3).

Los adenovirus son la primera alternativa de vectorización cuando se trata de hacer transferencia de genes a células diferenciadas incapaces de proliferar, como por ejemplo las células neuromusculares o a células no explantables como el epitelio pulmonar (22). Aunque la integración de secuencias de DNA adenoviral en la célula blanco puede ocurrir, ésta no parece ser una parte integral del ciclo viral y es relativamente ineficiente. De ahí que se haga necesario realizar infecciones repetidas con estos vectores lo que puede inducir reacciones inmunes importantes (23-25).

El potencial de estos virus para vectorizar DNA de gran tamaño y para expresar un gen, al parecer en ausencia de replicación tanto viral como celular los hace atractivos como sistema de transferencia de genes. Además su tropismo natural por el epitelio respiratorio sugiere una estrategia para el tratamiento de enfermedades genéticas importantes como la fibrosis quística.

Vectores tipo herpes virus HSV-1

Estos son virus defectuosos del herpes, derivados de mutantes termosensibles incapaces de replicarse a temperaturas superiores a 31°C y que poseen un tropismo natural por las células del sistema nervioso. Este tipo de vectores pueden ser usados para introducir genes en neuronas en cultivo y en el cerebro de mamíferos adultos (26).

El genoma de los HSV-1 es una molécula lineal de DNA de doble banda, la cual codifica aproximadamente 75 genes. Las partículas virales son estructuras que constan del DNA, una capsida proteica icosaédrica, una capa de proteínas o tegumento y una bicapa lipídica obtenida de la membrana nuclear de una célula la infectada. En esta bicapa están embebidas las glicoproteínas codificadas por el virus, responsables de la fusión entre la bicapa lipídica del virus y la membrana plasmática de la célula a infectar, liberando el resto de la partícula viral al citoplasma. Una vez dentro de la célula el DNA del HSV-1 llega hasta el núcleo donde sus genes son transcritos en cascada. Inicialmente son expresados los genes IE ("Immediate early") que codifican las proteínas reguladoras más importantes del virus.

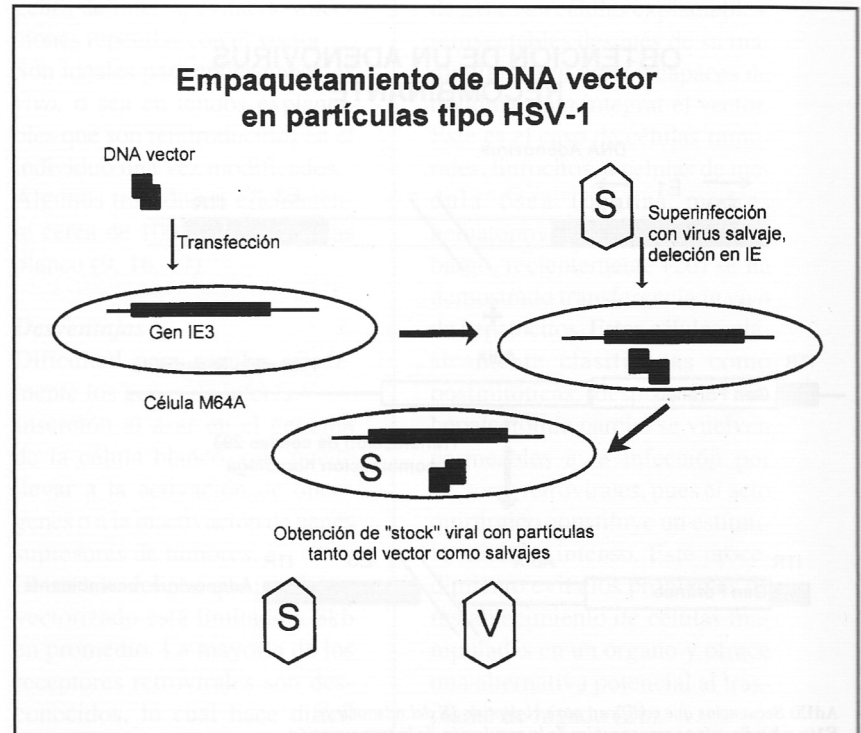


Figura 4. El DNA vector es introducido por transfección con fosfato de calcio en células M64A, portadoras de una copia del gen IE (proteínas reguladoras más importantes del virus). Posteriormente estas células son superinfectadas con una cepa del HSV-1 con una deleción de IE. El "stock" viral resultante contiene partículas ya sea con el DNA vector o con virus tipo salvaje. Modificado de ref3.

Estas proteínas IE activan la expresión de los genes que codifican las enzimas responsables de la replicación del DNA. Los genes tardíos son expresados después de la replicación del DNA y codifican la mayoría de componentes de la partícula y las enzimas que los ensamblan (3).

Prototipo de un vector HSV-1 defectuoso

Normalmente contiene una unidad de transcripción compuesta de un promotor, un gen y elementos de procesamiento. Contiene también dos secuencias HSV-1 responsables de la replicación y el empaquetamiento del vector. También posee secuencias plasmídicas bacterianas de *E. coli*.

El vector prototipo pHS Vlac tiene el gen Lac Z de *E. coli* bajo el control del promotor HSV-1 IE, promotor constitutivo que funciona en muchos tipos de células. Normalmente el vector es construido y amplificado en *E. coli* empleando técnicas de biología molecular corrientes. El vector es transfectado por coprecipitación con fosfato de calcio a células M64A (las cuales tienen una copia integrada del gen IE del HSV-1). Posteriormente estas células son superinfectadas con la cepa del HSV-1 17D30EBA, que tiene una deleción del gen IE, luego son expandidas y el "stock" viral resultante es utilizado en los experimentos de expresión (3) (Figura 4).

El gen Lac-Z en el vector pHSVlac puede ser reemplazado virtualmente por cualquier gen, por ejemplo un gen que codifica para un producto de secreción como el factor de crecimiento o una hormona peptídica, o por un gen que codifica una enzima o un receptor. Hay tres variables básicas que pueden ser manipuladas cuando se usan vectores tipo HSV-1 *in vivo*. Primero, el sitio de inyección determina cuáles células son infectadas; segundo, el promotor determina en cuáles de las células infectadas se expresa el gen, y, tercero, el gen expresado modificará las células o la fisiología del organismo en una forma predecible.

El potencial de aplicaciones de estos vectores de transferencia es ampli; desde el estudio de la función de productos génicos dentro de las neuronas, hasta la modificación de la fisiología neuronal *in situ* pues en principio, cualquier gen puede ser insertado en un vector HSV-1 defectuoso, incluidos aquellos que codifican para productos deficientes o mutados en las enfermedades degenerativas del sistema nervioso.

Vectorización por medio de liposomas

Los liposomas son de interés en terapia génica por su capacidad para encapsular y proteger los ácidos nucleicos, la posibilidad de su uso *in vivo* y la ausencia de peligro asociado con la infectividad viral. Los liposomas usados para transferencia de genes son de dos tipos. Los más recientemente introducidos tienen en su estructura moléculas anfipáticas cargadas positivamente. La mezcla de estos liposomas

con DNA, el cual es negativamente cargado, resulta en la asociación del DNA con la superficie del liposoma. Una carga residual positiva permite la interacción electrostática entre los liposomas y las células eucarióticas, las cuales a su vez están cargadas negativamente. En la segunda forma más convencional de liberación mediada por liposomas, los genes de interés (u otra forma de ácido nucleico) son encapsulados en los espacios acuosos de los liposomas durante la formación de los mismos. La encapsulación de los ácidos nucleicos en los liposomas es relativamente ineficiente, lo cual se compensa por la protección de éstos contra la degradación por nucleasas que no tienen acceso al interior de los liposomas.

La introducción de los liposomas a células específicas puede ser aumentada *in vitro* e *in vivo* por ligandos unidos o asociados con la superficie del liposoma. Estos incluyen anticuerpos dirigidos contra determinantes de la superficie celular o ligandos para los cuales las células tienen receptores. El tamaño, la composición lipídica, la naturaleza de la molécula encapsulada y el tipo de tejido usado son características que determinan la eficacia de la liberación del contenido liposomal. Esta liberación puede facilitarse por la adición de proteínas virales que promueven la fusión o por perturbaciones en la membrana de la célula blanco (27).

Los liposomas son vulnerables a los mecanismos protectores de los organismos contra partículas infecciosas y esto constituye una de sus desventajas principales en el reemplazo de genes por largo

tiempo: sin embargo, puede constituir una ventaja cuando se trata de inmunizaciones a través de ácidos nucleicos encapsulados en los mismos.

Terapia génica en el hombre y sus perspectivas

El desarrollo de métodos para introducir genes en las células de mamíferos ha estimulado un gran interés en la posibilidad de tratar un número importante de enfermedades humanas como la deficiencia de alfa-1 -antitripsina, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Parkinson; hemoglobinopatías, inmunodeficiencia severa combinada, leucemias, tumores malignos, errores congénitos del metabolismo, SIDA, etc., por medio de terapias basadas en genes. Como hemos visto, las herramientas usadas en la transferencia de genes son numerosas, cada una de ellas con ventajas y desventajas, de tal manera que la estrategia apropiada debe ser definida de acuerdo con la enfermedad que se desee considerar. Los resultados obtenidos permiten predecir un rico porvenir de la transferencia terapéutica de genes. Como mencionamos, son muchos los protocolos aprobados por el RAC. Algunos de estos protocolos involucran marcación genética de las células sin beneficio directo para el paciente y muchos otros evalúan la toxicidad del procedimiento más que su eficacia. La Tabla 2 resume los protocolos clínicos que están siendo aplicados en el hombre.

La primera autorización de reintroducción de células transducidas por retrovirus fue dada en los Estados Unidos para la inmunoterapia de melanomas

malignos con células TIL ("Tumor infiltrating lymphocytes") expandidos *in vitro* con la ayuda de IL-2. Se trataba en ese entonces de una marcación genética con el gen bacteriano de resistencia a la neomicina (NeoR) para verificar si después de las manipulaciones *in vitro* de las células, era posible reclutarlas en el tumor. Esta primera experiencia estuvo destinada esencialmente a esclarecer los mecanismos de acción de las células TIL en la respuesta inmune antitumoral. Queda la posibilidad de realizar con este sustrato celular protocolos verdaderos de terapia génica donde el gen transferido condicione para una sustancia antitumoral como el TNF, e igualmente el estudio del papel de oncogenes y genes supresores de la carcinogénesis (19, 28, 29).

La segunda experiencia de terapia génica se hizo en la deficiencia de adenosina deaminasa (ADA), enfermedad hereditaria que se presenta como una deficiencia inmune combinada severa, mortal a corto término en ausencia de trasplante alogénico de médula ósea. Hasta el momento dos niños se han beneficiado de la autotransfusión de linfocitos periféricos manipulados y transducidos *in vitro* con retrovirus a los cuales se había insertado el gen para la ADA (19, 28). Los resultados de evaluaciones regulares tanto del porcentaje de linfocitos circulantes que expresan el gen transferido, como de su función inmunitaria parecen prometedores. Sin embargo, el objetivo último de la terapia génica en las enfermedades constitucionales del sistema hematopoyético consiste en lograr transducir las células ma-

dres pluripotentes para un tratamiento único y definitivo. En el hombre las experiencias de transferencia a células madres hematopoyéticas (CMH) sobre modelos de cultivo *in vitro* a largo plazo han sido descritas por Blaese, et al (30) y Bordignon, et al (31). La preestimulación de CMH con factores de crecimiento, en particular IL-1, IL-6, o factor inhibidor de linfocitos (LIF), 48 h antes del contacto con vectores retrovirales, parece favorecer enormemente la integración de estos últimos. El éxito obtenido en ratones y animales de mayor tamaño permite esperar a mediano plazo la aplicación exitosa de este tipo de metodologías en el hombre.

Más recientemente ha sido desarrollada una aproximación *ex vivo* de terapia génica para la hipercolesterolemia familiar (FH). En una paciente fueron introducidos hepatocitos autólogos que habían sido genéticamente manipulados y corregidos con retrovirus recombinantes, vectores del receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL). La paciente toleró bien el procedimiento y los ensayos de hibridación *in situ* en tejido hepático después de cuatro meses de la terapia mostraron evidencia de expresión del gen transducido. La relación LDL/HDL en la paciente disminuyó de 10 a 13, antes de la terapia, a 5 a 8 después de la misma y ha permanecido estable más de 18 meses. Este protocolo representa el primer reporte de terapia génica en humanos, en la cual se ha logrado una corrección estable (21).

En relación con el SIDA, se han presentado resultados originales de suicidio condicionado de células infectadas después de trans-

Protocolo	Célula blanco	Enfermedad
Marcaje genético		
NeoR(1)	TIL (2)	Melanoma maligno
NeoR	TIL	Cáncer ovario
NeoR	TIL	Carcinoma renal
NeoR	Médula ósea	Leucemia linfóide y mieloide aguda
NeoR	Médula ósea	Neuroblastoma
NeoR	Médula ósea	Leucemia linfóide crónica
NeoR	Hepatocitos	Deficiencia hepática
Terapia génica		
ADA (3)	Linfocitos T periféricos	Inmunodeficiencia severa combinada
ADA	Progenitores médula ósea	Inmunodeficiencia severa combinada
TNF (4)	TIL	Melanoma maligno
TNF	Células tumorales	Cáncer avanzado
IL-2 (5)	Células tumorales	Cáncer avanzado neuroblastoma renal
IL-4 (6)	Tumor alogénico-autólogo	Melanoma
GM-CSF (7)	Tumor autólogo	Cáncer renal
IFN-gama (8)	Tumor autólogo	Melanoma
MDR-1 (9)	CMH CD34+	Cáncer ovario
Factor IX	Fibroblastos autólogos de piel	Hemofilia B
R-LDL (10)	Hepatocitos	Hipercolesterolemia familiar
HSV-tk (11)	Células cáncer ovario	Cáncer ovario
HLA-B7 (12)	Melanoma <i>in vivo</i>	Melanoma maligno
HSV-tk	Linfocitos T citotóxicos	SIDA
Glucocerebrosidasa	CD34+, PBLs	Enfermedad de Gaucher
FACC (13)	CD34+	Anemia de Fanconi
CFTR (14)	Tracto respiratorio	Fibrosis quística

Tabla 2. Protocolos clínicos en los cuales está siendo aplicada la terapia génica.

Modificado de refs. 28 y 29.

(1) Resistencia a neomicina, (2) linfocitos infiltradores de tumores, (3) adenosina deaminasa, (4) factor de necrosis tumoral, (5) interleuquina 2, (6) interleuquina 4, (7) factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos, (8) interferón gama, (9) multiresistencia a drogas, (10) receptor de lipoproteínas de baja densidad, (11) tirosina kinasa de HSV, (12) antígeno de histocompatibilidad B7, (13) gen para el grupo de complementación C de la anemia de Fanconi, (14) regulador de conductividad transmembranal de la fibrosis quística.

ferir un vector que incluía el gen de la timidina kinasa (tk) del virus herpes, sobre el control de secuencias reguladoras del genoma del HIV (1, 29). El tratamiento de las células con aciclovir indujo un suicidio selectivo de las células infectadas. Los blancos de la terapia génica en el SIDA podrían estar representados por las CMH que serían manipuladas *in vitro* y luego auto trasplantadas, aunque lo ideal sería poder transducir estas células blanco *in vivo*. Un adenovirus recombinante que infectaría múltiples tipos celulares pero en los que la expresión estaría condicionada por la presencia de secuencias virales endocelulares constituiría en este contexto una alternativa alentadora (3). Los antivirales genéticos definidos como elementos DNA o RNA que son transferidos dentro de las células y afectan sus blancos intracelulares, ya sea directamente o después de expresión como RNA o proteínas, incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, señuelos de RNA ("decoys"), mutantes transdominantes, toxinas e inmunógenos, ofrecen la posibilidad de atacar simultáneamente múltiples sitios en el genoma del HIV y se ha demostrado que inhiben efectivamente la replicación del HIV-1 *in vitro*, pero sus aplicaciones *in vivo* todavía son cuestionadas principalmente por la ausencia de un sistema eficiente de liberación (32).

La transferencia de genes tiene también aplicaciones múltiples en el campo de las vacunas y especialmente de las vacunas vivas recombinantes, utilizando virus o bacterias atenuadas como vectores. Adicionalmente está el campo de la inmunización

intracelular en la cual la célula del huésped se volvería inmune a la infección por transferencia de una parte apropiada del genoma del virus o bacteria contra la cual se busca protección. Estas técnicas están todavía por desarrollarse pero permiten esperar nuevas medidas de prevención contra muchas enfermedades infecciosas (3, 33).

Consideraciones éticas e implicaciones sociales de la terapia génica

Existe el consenso general de que la terapia génica somática, con el propósito de tratar o corregir una enfermedad es una opción terapéutica ética. Sin embargo, hay controversias considerables en lo que a terapia génica de las células germinales se refiere. Se piensa que la manipulación de las células germinales podría tener repercusiones impredecibles en las generaciones del futuro. La medicina es una disciplina inexacta y todavía no entendemos completamente la forma como funciona el cuerpo humano. El sentimiento de una gran mayoría de estudiosos del tema es que la terapia génica en células germinales no debe ser considerada hasta cuando hayamos aprendido lo suficiente sobre terapia génica somática y hasta que los estudios en animales demuestren la seguridad de los procedimientos a realizar.

Los productos para terapia génica deben ser el resultado de la combinación de tres pasos, cada uno de los cuales es considerado como un nivel en el cual deben aplicarse estrictos controles (8).

1. Clonación, aislamiento y amplificación de las secuencias te-

rapéuticas de DNA en un microorganismo.

2. Introducción de las secuencias terapéuticas dentro de un vector el cual puede ser un DNA plasmídico, un virus defectuoso o complejos moleculares sintéticos.

3. Transducción a la célula blanco mediante un sistema vectorial. El beneficio terapéutico debe ser alcanzado como resultado de la combinación de estos tres elementos. Además de la regulación aplicada a cada paso separadamente una atención especial debe darse al producto final de la combinación. Debe demostrarse que se ha construido la secuencia correcta y se ha mantenido estable durante los pasos de amplificación, antes y después de la transferencia. Se debe presentar una descripción completa de los procedimientos usados en la producción del vector, conjuntamente con la descripción y caracterización completa de los materiales utilizados en su producción. Un prerrequisito fundamental es la seguridad, tanto del paciente como del medio ambiente.

La regulación de los aspectos seguridad/eficacia debe ser realizada por comités éticos y revisiones científicas, y la producción a gran escala de estos productos biológicos por agencias estatales de control médico y aun de carácter internacional.

Los aspectos éticos de la terapia génica son un tema de capital importancia. En los Estados Unidos el RAC está encargado de la revisión y aprobación de los protocolos clínicos. Además de los aspectos de seguridad, el RAC establece recomendaciones relacionadas con aspectos científicos, médicos, sociales y éticos

de cada propuesta y realiza debates públicos sobre el tema. En Europa no existe una entidad de regulación establecida hasta el momento, pero en los diferentes países hay sistemas de regulación y revisión de los diferentes protocolos antes de su aplicación en el hombre. En Colombia según resolución número 8430 de 1993 (34), por la cual se establecen las normas para la investigación en salud, se determina que corresponde al Ministerio de Salud formular las políticas de regulación de la investigación. Aunque en dicha resolución no se considera específicamente la terapia génica, en su capítulo II (sobre la investigación farmacológica) y su título IV capítulo I (de la investigación con microorganismos patógenos o material patógeno que pueda contenerlos) y capítulo II (de la investigación que implique construcción y manejo de ácidos nucleicos recombinantes), se contempla la posibilidad de la utilización de esta nueva tecnología con fines terapéuticos y se dictan, a grandes rasgos, las normas de seguridad que deben guiar el trabajo de investigación en este campo. Sin embargo, la trascendencia e implicaciones éticas que se derivan de este tipo de tecnología, exige una evaluación rigurosa de cada proceso y es muy probable que los institutos de investigación y los centros que de acuerdo con la Misión de Ciencia, Educación y Desarrollo serían creados en todo el país, en las áreas de las ciencias básicas y biomédicas, en un futuro no muy lejano, sean los llamados a liderar la implementación y regulación de las posibles aplicaciones y transposición en el hombre de la terapia génica.

Glosario

Bicapa: Se refiere a la doble capa de lípidos y proteínas que constituyen la mayor parte de las membranas celulares.

Cápside: Capa protéica externa de una partícula viral.

Clon: Describe un número extenso de células o moléculas idénticas provenientes de una sola célula o molécula ancestral.

Encapsidar: Proceso a través del cual un material genético de origen viral, bacteriano o eucariótico es empacado dentro de la cápside viral.

Explantable: Se refiere al proceso mecánico de retirar tejidos u órganos de un organismo para su posterior cultivo o mantenimiento *in vitro*.

Ligando: Es la molécula que se une específicamente con su propio receptor.

Vector del clonación: Es un plásmido o bacteriófago que es utilizado para transportar DNA extraño insertado con el propósito de producir más material o un producto protéico.

Delección: Es generada a través de la remoción de una secuencia de DNA, y la reunión posterior de las secuencias en ambos extremos de la delección.

Transducción: Se refiere a la transferencia de un gen bacteriano de una bacteria a otra por medio de un fago. También describe la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucarióticas a través de los retrovirus.

Transfección: En células eucarióticas refiere a la adquisición de marcadores genéticos nuevos por medio de la incorporación de un DNA exógeno.

Totipotencialidad: Se refiere a la característica de las células indiferenciadas a través de la cual dichas células se pueden

potencialmente diferenciar en cualquier tipo celular dependiendo de las características de su micro-ambiente..

Abstract

The tremendous development of molecular biology during the past decade has allowed the application of recombinant DNA technology in humans for therapeutic purposes. The dream became a reality.

The vectors more frequently used to transfer genes include retroviruses, adenoviruses, herpes viruses and liposomes. Each one of them has its own advantages and disadvantages regarding the disease and the cell type in which a specific gene therapy would be employed. Worldwide there are more than 80 clinical protocols under evaluation and the number increases every day. The control and regulation of these protocols must include their independent evaluation, in addition to *in vitro* models as well as studies in experimental animals before their application to humans. The country should be prepared, both in terms of its scientific and technological capabilities as in the legal and ethical matters, to handle this new therapeutic approach.

Referencias

1. Tiberghien P. Use of suicide genes in gene therapy. *J Leuk Biol* 1994; 56: 203-209.
2. Gonik L, Wheelis M. Guide illustre de la genetique. 2 ed. Pan's. Librairie Classique Eugene Belin, eds. 1986: 3-363.
3. Cohen-Haguenaer O, Boiron M. Human gene transfer. 1 ed. Montrouge: Les Editions Inserm 1991: 3-363.
4. Gu H, Marth J, Orban P, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-106.
5. Salmons B, Gunzburg W. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. 1993. *Hum Gen Ther* 1993; 4: 129-141.

Transferencia de genes

6. Cohen-Haguenaer O, Boiron M. Thérapie génique: réalités et perspectives. *Path Biol* 1992; **40**: 5-13.
7. Mulligan R. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; **60**: 926-931.
8. Cohen-Haguenaer O. Regulation of gene therapy in Europe: a current statement including reference to US-regulation. *Eur J Cancer* 1994; **30**: 1193-1201.
9. Guild B, Finer M, Housman D, Mulligan R. Development of retrovirus vector useful for expressing genes in cultured murine embryonal cells and hematopoietic cells in vivo. *J Virol* 1988; **62**: 3795-3801.
10. Morgan R, Nusban O. Analysis of the functional and host-range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J virol.* 1993;**67**:4712-4721.
11. Lehn P. Vecteurs rétroviraux pour le transfert de genes dans le tissu hématopoïétique in vivo. *Med Sci* 6: 791-799.
12. Dick J, Magli MC, Phillips R, Bernstein A. Genetic manipulation of hematopoietic stem cells with retrovirus vectors. *Trends in Gent* 1986; 165-170.
13. Danos O. Construction of retroviral packaging cell lines. En: M Collins eds. *Methods in Molecular Biology*. Clifton NJ. The human Press Inc 1991; 17-27.
14. Markowitz D, Goff S, Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *J Virol* 1988;**167**:400-406.
15. Markowitz D, Goff S, Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 1988; **62**: 1120-1124.
16. Maganto P, Sierra E, Herrero J. General principles of gene therapy. *Transplantol* 1993; **4**: 30-36.
17. Kerr W, Mulé J. Gene therapy: current status and future prospects. *J. Leuk Biol* 1994; **56**: 210-214.
18. Otto E, Jones-Trower A, Vanin E, et al. Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging vector sequences. *Human Gene Ther* 1994; **5**: 567-575.
19. Cournoyer D, Caskey T. Gene Therapy of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 297-329.
20. Cardoso J, Branschereau S, Heard JM, et al. In situ retrovirus mediated gene transfer into dog liver. *Human Gene Ther.* 1993; **4**: 411-418.
21. Grossman M, Raper S, Wilson J, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genetics* 1994; **6**: 335-341.
22. Cohen-Haguenaer O, Caskey T, Boiron M. First international workshop on human gene transfer. *Human Gene Ther* 1992; **3**: 163-165.
23. Descamps U, Blumenfeld N, Beuzard Y, et al. Efficient adenovirus mediated erythropoietin (Epo) expression in mice. First meeting of the European working group on human gene transfer and therapy. Baveno Italy 1993; Abstract p29.
24. Mashhour B, Ragot T, Couton D, Perricaudet M, Briand P. In vivo adenovirus-mediated gene transfer into ocular tissues. First meeting of the European working group on human gene transfer and therapy. Baveno. Italy 1993; Abstract p 35.
25. Haddada H, Ragot T, Duffour M, Cardier L, Perricaudet M. Adenovirus mediated IL-2 gene transfer into tumor cells induces antitumoral immunity and tumor cells rejection. First meeting of the European working group on human gene transfer and therapy. Baveno. Italy. 1993; Abstract p 46.
26. Lowenstein P, Bain D, Epstein A, et al. Targeting of foreign proteins to the neuronal plasma membrane: studies using recombinant and amplicon HSV-1 vectors and an examination of helper function. First meeting of the European working group on human gene transfer and therapy. Baveno. Italy 1993; Abstract p 10.
27. Coutelle Ch, Caplen N, Gilchrist X, et al. A liposome based approach to gene therapy for cystic fibrosis. First meeting of the European Working group on human gene and therapy. Baveno. Italy 1993; Abstract p 18.
28. Anderson FW. Human gene therapy. *Science* 1992; **256**: 808-813.
29. Tankosic T. Gene transfer therapy. Therapeutic updates. Crug and market development Inc. 1992; **3**: 93-124.
30. Blaese M, Culver K, Leitman S. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. *Human Gene Ther* 1993; **4**: 521-527.
31. Bordignon C, Yu S, Gilboa E. Retroviral vector-mediated high-efficiency expression of adenosine deaminase (ADA) in hematopoietic long-term cultures of ADA-deficient marrow cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; **86**: 6748-6752.
32. Dropulic B, Jeang KT. Gene therapy for human immunodeficiency virus infection: Genetic antiviral strategies and targets for intervention. *Human Gene Ther* 1994; **5**: 927-939.
33. Russell S, Winter G, Stevenson F, Hamblin T, Hawkins R. Idiotype plasmid vaccination for follicular B-cell lymphoma. First Meeting of the European working group on human gene transfer and therapy. Baveno. Italy 1993; Abstract p. 43.
34. Ministerio de Salud de Colombia. Normas científicas, técnicas y administrativas para investigación en salud. Resolución 8430, Bogotá, Colombia, 1993.