

# **TERAPIA GÉNICA: EL DESAFÍO TERAPÉUTICO DEL SIGLO XXI**

**DRA. O. GRACIELA SCHAROVSKY**

**Instituto de Genética Experimental  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Rosario  
Santa Fe 3100 (2000) Rosario  
TE. 341- 4804559 Int. 244  
Fax: 341-4804569  
e-mail: ogs@citynet.net.ar**

## **TERAPIA GENICA: EL DESAFIO TERAPEUTICO DEL SIGLO XXI**

## **GENE THERAPY: THE XXI CENTURY THERAPEUTIC CHALLENGE**

### **RESUMEN**

La terapia génica es una forma de medicina molecular que probablemente tendrá un gran impacto en la salud humana a lo largo del siglo XXI. Tiene como objetivo modificar o reparar una alteración genética adquirida, corregir un error génico de nacimiento o dotar a una célula con una nueva función. Los avances recientes de la Biología Molecular y de la tecnología del ADN recombinante han hecho posible el desarrollo de este tipo de enfoque terapéutico. Esta novedosa metodología puede llegar a tener profundas implicancias en la forma en que se traten las enfermedades en el futuro. Se describen los distintos tipos de terapia génica que se están desarrollando en la actualidad, los requisitos que se deben cumplir para poder aplicarlos eficientemente, las desventajas de cada método, los genes más comúnmente transducidos y sus vías de administración. También se analizan las patologías hereditarias o adquiridas que son susceptibles de ser tratadas con terapia génica, tales como enfermedades neoplásicas, infecciosas, del sistema inmune o que afectan a diferentes órganos, así como las distintas estrategias implementadas para llevarla a cabo.

### **SUMMARY**

Gene therapy is a type of molecular medicine that will probably have a significant role in human health along the XXI century. Its goal is to modify or repair an acquired genetic alteration, to correct a congenital genetic error or to give to a cell a new function. The recent advances in molecular biology and DNA recombinant technology have made it possible to develop this novel therapeutic approach. Gene therapy will likely have in the future enormous influences in the way of treatment of different illnesses. In this review, the different types of gene therapy currently developed, the disadvantages of each method, the most commonly transduced genes, and their ways of administration are explained. Also, the hereditary or acquired pathologies amenable to enter in gene therapy protocols, like cancer, infectious or immune system diseases, or pathologies involving different organs, as well as the different strategies generated are described.

### **KEY WORDS**

Gene therapy, transduction, vector systems, suicide genes, antisense therapy.

La terapia génica es una forma de medicina molecular que, sin lugar a dudas, tendrá un gran impacto en la salud humana a lo largo del siglo XXI. Es una técnica que utiliza al ácido nucleico como molécula terapéuticamente útil. Tiene como objetivo modificar o reparar una alteración genética adquirida, corregir un error génico de nacimiento o dotar a una célula con una nueva función, mediante el reemplazo de un gen deficiente por uno normal, la corrección de un gen anormal, o la introducción de un gen terapéutico no relacionado en las células apropiadas. Esta estrategia terapéutica se basa en el empleo de la **transducción génica**, que consiste en la introducción de genes exógenos en una célula blanco mediante un sistema vector adecuado.

Hasta no hace mucho tiempo, una terapia génica exitosa se la podía pensar solamente en el terreno de la ciencia-ficción. Sin embargo, los avances recientes de la biología molecular y de la tecnología del ADN recombinante, que condujeron a la identificación de muchos genes importantes de enfermedades humanas y de sus productos proteicos, la han convertido en realidad. Se abrieron así nuevas oportunidades para la investigación y, como consecuencia de ello para el planteo, de nuevas estrategias terapéuticas en el manejo de muchas enfermedades, tanto genéticas como adquiridas.

Es importante señalar que, aunque en la actualidad se presente a la terapia génica como la nueva panacea en medicina, su impacto terapéutico en el futuro inmediato va a ser limitado, debido a la existencia de una serie de dificultades técnicas no resueltas hasta el momento. El éxito de su aplicación dependerá del esfuerzo conjunto de investigadores de las ciencias básicas y clínicas que deberán superar eficientemente tales dificultades.

A partir de 1988, fecha del primer protocolo autorizado en USA, se han desarrollado en todo el mundo, más de 500 protocolos clínicos de terapia génica (principalmente de fase I y II) para el tratamiento en especial del cáncer y de patología hereditaria de tipo monogénico. En épocas muy recientes se han incorporado protocolos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y del SIDA. En la actualidad existen numerosos protocolos pre-clínicos en ejecución que estudian la factibilidad del empleo de terapia génica para el tratamiento de diversos tipos de patologías, tales como alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurológicas y regeneración de tejidos.

En el Cuadro N° 1 están indicados el número de protocolos y de pacientes implicados en ellos por continente, en un relevamiento llevado a cabo en mayo de 2001 (1). Es de hacer notar que de los 534 protocolos indicados la mayor parte se llevaron o llevan a cabo en USA (407; 76.2%), en el Reino Unido (43; 8.1%), en Francia (15; 2.8%), en Canadá (11; 2.1%), y en Alemania (10; 1.9%), correspondiendo el resto a diferentes países.

Como se puede observar en el Cuadro N° 2 (1), el tratamiento del cáncer es la indicación más frecuente para este tipo de terapia, siguiéndole en importancia las enfermedades monogénicas, la marcación génica y las enfermedades infecciosas.

### **TIPOS DE TERAPIA GÉNICA**

Teóricamente, son posibles dos tipos de terapia génica en las que: 1) las **células somáticas**, ó 2) las **células de línea germinal** son modificadas genéticamente para corregir el defecto genético.

La terapia de células somáticas consiste en el tratamiento de la enfermedad genética en determinadas células del individuo, pero si el mismo es portador de una mutación heredada, la progenie podría heredar el gen mutante; es decir que se “curarían” las células tratadas pero no el resto de ellas, portadoras de la mutación. Por otra parte, la terapia de las células germinales resultaría en una cura completa, ya que el gen mutante sería reemplazado por el gen normal, dando lugar así a células normales en la totalidad del individuo.. Mientras que ambos tipos de terapias han sido desarrolladas en organismos no humanos, solamente la terapia de células somáticas se ha intentado en humanos, debido a los problemas éticos del tratamiento de células germinales. Existe acuerdo universal de que la terapia génica de línea germinal es moralmente y éticamente inaceptable. Por lo tanto, todos los programas se enfocan a la terapia génica de células somáticas, en las que la alteración en la información genética está dirigida a células, tejidos u órganos específicos en los cuales el desorden es manifiesto.

Es muy extensa la cantidad de material escrito y publicado acerca tanto del uso potencial como del abuso de la terapia génica. Varios países ya han establecido cuerpos reguladores para controlar los aspectos técnicos, terapéuticos y de seguridad de los programas de terapia génica. Tanto en U.S.A. como en el Reino Unido se ha determinado la necesidad de controles rigurosos ejercidos por distintos tipos de comités (FDA, Comité asesor de ADN recombinante en USA y Comités de Ética de la Terapia Génica en U.K.) para la aprobación de este tipo de programas. De todos modos, todavía no se ha llegado a un consenso universal acerca de las regulaciones y controles que se deberían implementar para asegurar la rigurosidad científica en este tipo de terapéutica y la seguridad en su aplicación. La polémica continúa y seguramente los años venideros traerán novedades al respecto (2).

### **REQUISITOS PARA LA TERAPIA GÉNICA**

Para que una patología determinada pueda ser tratada efectivamente con terapia génica, deben cumplirse una serie de condiciones fundamentales:

- En primer lugar, y como es obvio, el gen terapéutico que se desea introducir debe haber sido clonado. Esta información debería incluir, no solamente el gen estructural, sino también las secuencias de ADN involucradas en el control y regulación de la expresión del gen. Este requisito parece obvio, pero alguno de los primeros intentos de terapia génica experimentales se llevaron a cabo al principio de los años 80, cuando se sabía muy poco acerca de regiones reguladoras o de control de los genes estructurales necesarias para la expresión del gen. De esa manera, las posibilidades de éxito eran mínimas.

- Se debe contar con un método eficiente y seguro para introducir dicho gen en la célula blanco. Si la terapia génica quiere ser considerada como una alternativa realista al tratamiento convencional, debe haber evidencia inequívoca, proveniente de proyectos de terapia génica llevados a cabo en animales, de que el gen insertado funciona apropiadamente, con secuencias reguladoras, promotoras y exacerbadoras adecuadas. Además, se debe demostrar que el tejido o población celular tratados tienen un tiempo de vida razonable, que el producto génico continúa expresándose, y que el organismo no reacciona en su contra, por ejemplo produciendo anticuerpos contra el producto proteico.

- Las células específicas, el tejido o el órgano de una persona con un desorden genético, deben estar identificados y ser accesibles. Por ejemplo, los primeros intentos de tratar la beta talasemia, un desorden hereditario de la hemoglobina, involucraban a todas las células de la médula ósea, mientras que lo correcto sería tratar específicamente el pequeño número de células madre de médula ósea a partir de las cuales se originan las células rojas inmaduras y los reticulocitos.

- Finalmente, es esencial demostrar que la introducción del gen foráneo o secuencia de ADN no tiene efectos deletéreos, tales como llevar inadvertidamente a una enfermedad maligna, o efecto mutagénico, tanto en células somáticas como en germinales. La posibilidad de afectar a las células germinales debe ser considerada, aún cuando el tratamiento se dirija a las células somáticas.

## **MÉTODOS DE TERAPIA GÉNICA**

La terapia génica puede ser realizada tanto *ex vivo* (o *in vitro*) como *in vivo*.

La metodología *ex vivo* consiste en el tratamiento *in vitro* de las células o tejidos de un individuo afectado o de un donante, a las que se les transfiere, con diferentes vectores, el gen terapéutico, para ser luego introducidas como un injerto en el sitio de interés.

La metodología *in vivo* emplea vectores de ADN recombinante para transducir las células somáticas con el gen terapéutico, directamente en el paciente, cuando las células no pueden ser cultivadas o reemplazadas en el individuo afectado.

La célula a la que se le ha introducido un gen en forma artificial es llamada **célula transgénica**, y al gen involucrado se lo denomina **transgen**.

#### **SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA**

Para la transfección, tanto *in vivo* como *ex vivo*, se utilizan distintos vectores, es decir diferentes sistemas que permiten introducir el ADN en la célula de interés. En general, podemos clasificarlos en **sistemas virales** y **no virales**.

##### **Sistemas virales**

Se pueden utilizar una serie de virus diferentes para transportar el material genético foráneo dentro de las células. Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas particulares.

##### *Retrovirus*

Son los virus a ARN (3,4); derivan de una familia de virus que incluyen el virus humano de la inmunodeficiencia y virus que en ciertas especies pueden causar cáncer. Son los sistemas vectores virales más desarrollados y utilizados hasta el momento. Penetran en las células a través de receptores específicos

Los retrovirus usados en terapia génica son manipulados con metodología de ADN recombinante de tal manera que se les incorpora el gen terapéutico y se los vuelve incapaces de replicarse en forma independiente, con el objeto de no producir efectos colaterales asociados con la infectividad viral.

Estos virus portan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez que el virus infecta a la célula, el genoma de ARN se transcribe hacia atrás en la forma de ADN, utilizando la enzima transcriptasa reversa, y se integra al ADN de la célula infectada. Este ADN viral se llama provirus, se integra de manera estable y se expresa como cualquier otro gen de la célula huésped. El provirus así formado es el molde para la producción de los ARNm para los varios productos génicos virales. Si el virus está integrado en forma estable en células progenitoras en división, todas las progenies subsiguientes de células heredarán una copia del genoma viral.

Una de las desventajas del uso de retrovirus es que solo pueden portar y, por lo tanto, introducir en la célula blanco, secuencias pequeñas de ADN, usualmente menos de 8kb, limitando su uso en terapia génica. Muchos de los genes a introducir son más grandes de lo que se puede incorporar en un retrovirus. Una segunda desventaja es que estos retrovirus solo

pueden infectar una célula que está en división. Es decir que las células en G<sub>0</sub> no son transfectadas. Otras desventajas son: su inestabilidad, el hecho de que no se puede excluir completamente la posibilidad de contaminación con retrovirus competentes o de que se produzca el empaquetamiento de ARN con potencial oncogénico

#### *Adenovirus*

Los virus a ADN (3,4) pueden ser usados como vectores en terapia génica, ya que infectan una gran variedad de células. Los vectores adenovirales para terapia génica son adenovirus que han sido modificados genéticamente por delección de parte del genoma viral, de tal manera de crear espacio para portar un gen extraño al mismo. Tienen ventajas sobre los retrovirus porque son estables y pueden ser fácilmente purificados para producir títulos altos para la infección. A diferencia de los retrovirus, pueden infectar células que no están en división y pueden llevar hasta 36kb de ADN extraño.

Los adenovirus no se integran en el genoma del huésped, lo que evita la posibilidad de mutagénesis insercional, pero tienen la desventaja de que la expresión del gen introducido es generalmente inestable y transitoria. Además, en virtud de su infectividad, pueden producir efectos adversos secundarios a la infección, por estimulación de la respuesta inmune del huésped a los antígenos adenovirales (5). Por último, los adenovirus contienen genes conocidos que están involucrados en la transformación maligna, de tal manera que constituyen un riesgo potencial de inducción de una enfermedad maligna.

### **Sistemas no virales**

#### *Liposomas*

Los liposomas son esferas huecas de 0.025 a 1 micra de diámetro, compuestos por una variedad de lípidos dispuestos en una o varias láminas, que tienen una cara hidrofílica hacia el exterior y otra hacia el interior. De esta manera están habilitados por un lado, para transportar en su interior moléculas hidrofílicas como los genes terapéuticos y por otro, para atravesar la membrana celular dada su liposolubilidad. Los liposomas se forman espontáneamente cuando se suspenden ciertos lípidos en solución acuosa. De acuerdo a su carga se clasifican en liposomas aniónicos o catiónicos, siendo estos últimos los más eficientes para la transferencia génica. Esta metodología tiene la gran ventaja de ser obviamente no infectiva y de poder cargar secuencias de ADN mucho más largas que en los sistemas virales. Entre las desventajas se pueden nombrar la baja eficiencia de transfección y la expresión transitoria del transgen. La entrega génica con liposomas es utilizada preferentemente para terapia génica *in vivo* de diversos tejidos (4).

### *Transferencia de ADN desnudo.*

La transferencia directa de ADN purificado de plásmido produce una expresión transitoria del transgen. Esta metodología ha demostrado ser eficiente solamente en músculo esquelético o cardíaco (3).

### *Endocitosis mediada por receptor*

Otra forma de transferir un gen es unir el ADN a ligandos polipeptídicos que son reconocidos por un receptor presente en la superficie de la célula que se quiere transfectar. Por ejemplo, el ADN unido a una proteína que tenga galactosa será reconocido por los receptores en la superficie de las células hepáticas que son específicos para glicoproteínas que tienen una galactosa terminal. La unión del complejo ADN-ligando al receptor provocará la internalización del mismo en vesículas endocíticas que son transportadas a los lisosomas donde el complejo es degradado. Para que el gen pueda expresarse tiene que escapar del lisosoma sin ser degradado. La eficiencia de transfección de este sistema es baja.

### *Oro coloidal*

El ADN de plásmido puede ser unido a partículas de oro coloidal de 1 micra de diámetro y luego disparadas a gran velocidad, mediante distintas técnicas, hacia las células que se desea transducir. Como el ADN así entregado no tiene mucha penetración, puede ser utilizada en la terapia génica de células superficiales. Dadas sus características se la conoce como la técnica de la pistola genética.

## **TIPOS DE GENES**

La variedad de genes involucrados en protocolos de terapia génica tanto experimentales como clínicos, es muy grande. Los genes utilizados más frecuentemente incluyen: a) citoquinas, como GM-CSF, IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  ó  $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  (6-10); b) antígenos, como CEA, gp100, HIV-IT, HLA-B7, MART-1, PSA, SPARC (11-14), etc.; c) deficientes, como AAT, ADA, CD18, factor IX, etc (15-17); d) suicidas, como CD (citosin deaminasa), Enterotoxina B del *Staphylococcus*, TK (tirosin quinasa) (18, 19); e) supresores tumorales, como BRCA1, p53, Rb (20,21).

## **PROCEDENCIA DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS**

Cerca del 90% de los protocolos de terapia génica utilizan células autólogas para transducir el gen terapéutico. En ocasiones, cuando un paciente infectado con HIV presenta la posibilidad de reinfección por transplante de sus propias células sanguíneas, se utilizan células

singeneicas, por ejemplo provenientes de un hermano mellizo no infectado. En algunos protocolos se emplean células alogeneicas e inclusive xenogeneicas.

### **VÍAS DE ADMINISTRACIÓN**

Las diferentes patologías a tratar plantean la necesidad de utilizar distintas vías de administración del gen terapéutico. En orden decreciente de frecuencia, las vías más utilizadas son la intratumoral, intravenosa, subcutánea, trasplante de médula ósea, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, etc.

### **TERAPIA GÉNICA ANTISENTIDO**

Hasta ahora hemos hablado de un tipo de terapia génica en la que la molécula de ADN que se introduce en las células tiene el mismo sentido que el gen que se quiere introducir, es decir el sentido 5'-3', o sea que introducimos el gen propiamente dicho. Este tipo de terapia génica se llama sentido o más comúnmente *sense* y, como señalamos anteriormente, tiene como objetivo lograr la expresión de dicho gen, o, dicho de otra manera, la ganancia de una función. Pero también se puede llevar a cabo un tipo de terapia génica llamada antisentido o *antisense*, la cual tiene como objetivo la inhibición de la expresión de un gen determinado, es decir, la pérdida de la función ejercida por la proteína que codifica el gen alterado.

En la terapia génica antisentido se utilizan oligonucleótidos que se sintetizan para que se unan a secuencias específicas de ARN.

La forma más simple de esta “droga genética” es un pequeño trozo de ADN, un oligodeoxinucleótido, que tiene el sentido 3'-5', es decir, el contrario al sentido normal de lectura 5'-3' y que se une por complementariedad de bases de Watson-Crick a una secuencia determinada de ARN. Esta sustancia puede ser sintetizada químicamente y administrada a la célula o tejido a tratar, o puede ser producida biológicamente, por ejemplo por el uso de un vector apropiado, como un plásmido o un virus atenuado en la forma de un ARNm antisentido.

La otra forma relacionada es la que utiliza ribozimas que son ribo-oligómeros catalíticos que degradan en una secuencia determinada al ARNm complementario, luego de unirse al mismo vía el apareamiento de bases.

Las dos modalidades mencionadas pueden bloquear el procesamiento del ARN y la subsiguiente traducción. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar estos efectos. Este tipo de enfoque terapéutico ha despertado muchas esperanzas y es muy atractivo por la simplicidad de una idea elegante. Pero, en la práctica, así como en cualquier modalidad

terapéutica, aparecen los problemas, los cuales podrían ser resumidos de la siguiente manera: 1) degradación del oligómero *in vivo*, 2) captación ineficiente por parte de la célula, 3) unión no específica, 4) rotura del ARN no específica.

## **ENFERMEDADES TRATABLES CON TERAPIA GENICA**

### **Enfermedades neoplásicas**

Las estrategias para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas están evolucionando rápidamente. Mientras que la quimioterapia se aplica fundamentalmente para reducir grandes masas tumorales, se ha puesto gran atención en el desarrollo de nuevas terapias para eliminar la enfermedad residual. Dentro de esta tendencia, distintas estrategias basadas en la terapia génica están siendo utilizadas para el tratamiento biológico de los tumores: I) estimulación de la respuesta inmune, II) genes suicidas, III) transferencia de genes supresores tumorales, IV) inactivación de oncogenes, V) genes de resistencia a drogas.

#### ***Estimulación de la respuesta inmune***

La administración sistémica de citoquinas con el objeto de amplificar una respuesta inmune antitumoral ya establecida, o de inducir nuevas células efectoras, tiene el inconveniente de su gran toxicidad. La alternativa planteada fue la introducción de citoquinas en las células tumorales mediante técnicas *ex vivo* e *in vivo*. Existen numerosos informes de experimentos en los cuales se ha demostrado que la transferencia génica de citoquinas individuales, incluyendo Interleuquinas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF y G-CSF, ha logrado inducir respuestas inmunes antitumorales que estuvieron acompañadas de grados muy variables de rechazo tumoral (6, 8, 22, 23).

Otra forma de estimular la respuesta inmune antitumoral consiste en administrar vacunas de antígenos tumorales. La forma más frecuente consiste en transfectar células dendríticas autólogas, que son las mejores células presentadoras de antígenos, con ADN o ARNm que codifica para antígenos tumorales y administrárselas al paciente. Este procedimiento disparará una respuesta linfocitaria antitumoral. El antígeno CEA en cáncer de colon y el MART1 en melanoma se han utilizado para este tipo de estrategia terapéutica (24, 25).

Los linfocitos T (LT) requieren dos señales para activarse. La señal uno es generada por la interacción entre el receptor para el antígeno del LT y el complejo formado por el antígeno y las moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) pertenecientes a las células presentadoras de antígenos. La segunda señal es provista por moléculas co-estimuladoras de las células presentadoras, especialmente la molécula B-7 que se une a los

receptores CD28 y CTLA4 del LT. Sin la señal co-estimuladora las células T no pueden responder al antígeno. Muchas células tumorales carecen de la molécula B-7, lo que dificulta su reconocimiento por los LT. La transfección de B-7 en células tumorales ha resultado en regresiones tumorales, por ejemplo en tumores cerebrales (7).

### ***Genes suicidas***

Los genes suicidas transferidos a células tumorales permiten diferenciar artificialmente estas células de las normales, ya que codifican para una enzima que es capaz de modificar una pro-droga no tóxica, convirtiéndola en un metabolito tóxico que lleva a la muerte de la célula. El sistema más utilizado es el integrado por el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) y la pro-droga ganciclovir o aciclovir (18). El ganciclovir fosforilado inhibe la síntesis de ADN no solamente en las células transducidas sino también en las células vecinas (efecto “bystander”). Otro sistema ampliamente explorado es el del gen de la citosina deaminasa (CD) de *E. coli* y la pro-droga 5-fluorocitosina (26).

### ***Transferencia de genes supresores tumorales***

La ausencia de genes supresores tumorales o la pérdida de su función por diversas alteraciones anula las vías de señalización que inducen la muerte celular por apoptosis y contribuyen así a la falta de control del crecimiento celular. La restitución del gen supresor tumoral salvaje, por transferencia génica, le devuelve a la célula un mecanismo normal de control proliferativo que tiene efecto antitumoral. El gen supresor tumoral p53, el más frecuentemente mutado en los tumores humanos, ha sido objeto de mucha investigación en protocolos de terapia génica, obteniéndose resultados alentadores (20, 27).

### ***Inactivación de oncogenes***

En todos los tumores existen oncogenes que junto con los genes supresores tumorales son responsables del crecimiento neoplásico. La inhibición de su expresión, permitiría el retorno al crecimiento celular normal y a la desaparición del fenotipo maligno.

Para ello se ha desarrollado una técnica que se denomina **terapia génica antisentido** que consiste en la transferencia de un oligonucleótido de ADN que tiene la secuencia antisentido, es decir la secuencia complementaria, del ARNm que codifica para la proteína anormal cuya expresión se quiere eliminar. La unión del oligonucleótido antisentido con el ARNm correspondiente por complementariedad de bases a nivel del ribosoma, impide la síntesis de la proteína oncogénica. Ensayos experimentales con el oligonucleótido antisentido BCR-ABL suprimió el crecimiento de células leucémicas (28).

### ***Genes de resistencia a drogas***

La labilidad genética de los tumores favorece la generación de resistencia a los agentes quimioterápicos. Las células tumorales son capaces de evitar los efectos citotóxicos de dichos agentes mediante la expresión de genes capaces de eliminarlos o impedir su acción tóxica. Por ejemplo, la glicoproteína P, codificada por el gen MDR (resistencia a multidrogas), es una proteína de transmembrana que funciona expulsando el fármaco de la célula tumoral, impidiendo así su acción sobre la misma. El conocimiento a nivel molecular de este efecto indeseable en la quimioterapia de los tumores ha permitido plantear su utilización en provecho del paciente. La quimioterapia en altas dosis está limitada por su toxicidad a nivel de la médula ósea. La transferencia del gen MDR en células hematopoyéticas precursoras reinoculadas en el paciente, las convierte en resistentes al fármaco tóxico y permite utilizar dosis mucho mayores con muy buena tolerancia (29).

### **Enfermedades del Sistema Inmune**

La terapia génica está siendo considerada como un nuevo recurso terapéutico útil para el tratamiento de diversos desórdenes del sistema inmune tales como las enfermedades autoinmunes y las inmunodeficiencias.

#### ***Enfermedad autoinmune***

El nuevo enfoque terapéutico (30) presenta al menos tres estrategias posibles que consisten en modificar genéticamente: a) las células blanco para el ataque autoinmune (sinoviocitos en la artritis reumatoidea, células  $\beta$  del islote pancreático en la diabetes tipo I, etc) de tal manera que expresen citoquinas inmunoregulatorias que las protejan de la destrucción autoinmune; b) las células T autorreactivas, de modo que produzcan citoquinas antiinflamatorias que disminuyan la severidad de la lesión autoinmune; c) las células blanco y/o las autorreactivas para que sintetizen proteínas transgénicas tales como factores de crecimiento que ayuden a la reparación del tejido alterado.

Las citoquinas proinflamatorias IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  producidas por células Th1 parecen ser responsables de muchas enfermedades autoinmunes, mientras que las antitumorales IL-4 e IL-10 provenientes de células Th2 podrían tener un rol regulatorio. La transfección del gen de IL-4 en células  $\beta$  pancreáticas de ratón diabético no obeso (NOD) los protegió de la insulinitis que desarrollan espontáneamente (31). Utilizando otra estrategia, se transfectaron con IL-10, clones Th1 específicos para células  $\beta$ , los cuales transferidos a ratones NOD inhibieron la incidencia de diabetes (32).

#### ***Inmunodeficiencias***

La deficiencia de la adenosindeaminasa (ADA) produce una forma de inmunodeficiencia combinada severa con acumulación de trifosfato de dexosadenosina, sustancia tóxica para los linfocitos. Como consecuencia de ello, las respuestas inmunes celulares y humorales son deficientes, llevando al desarrollo de infecciones graves y finalmente a la muerte. Resultados experimentales previos mostraron la posibilidad concreta de lograr la corrección de la deficiencia. Actualmente, están en marcha estudios clínicos para el tratamiento de esta patología por transferencia del gen ausente en células hematopoyéticas precursoras (16).

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es la patología con deficiencia del sistema inmune más frecuente. Para su tratamiento se están desarrollando diversos ensayos preclínicos que enfocan la solución del problema desde distintas perspectivas como por ejemplo (33), transfección de un gen que previene la replicación del HIV (33) o terapia génica antisentido para inhibir la producción de la enzima integrasa del virus.

### **Enfermedades infecciosas**

El tratamiento de las patologías causadas por agentes infecciosos también está siendo explorado desde la perspectiva de la terapia génica. El problema puede ser encarado de diferentes formas, todas tendientes a eliminar el microorganismo, ya sea en forma directa, o bien en forma indirecta, vía la estimulación del sistema inmune o la utilización de diferentes drogas.

La expresión viral puede ser inhibida utilizando terapia génica antisentido, por ejemplo, durante la infección por HIV (34) y por HTLV-I (35). Otra forma de tratamiento consiste en transfectar genes suicidas seguidos de la administración de la pro-droga correspondiente. También, las transferencias génicas pueden hacerse con el objeto de estimular la síntesis de un anticuerpo específico para un patógeno determinado (36).

### **Enfermedades que afectan diferentes órganos**

#### ***Pulmones***

La fibrosis quística (FQ) y el enfisema pulmonar son las enfermedades hereditarias que afectan a los pulmones de mayor frecuencia. En ambos casos se están ensayando terapias génicas de reemplazo. La transfección con liposomas del gen salvaje CFTR (que se encuentra mutado en la fibrosis quística), en vías respiratorias, restaura la secreción de cloruros en ratones transgénicos. En la actualidad se espera poder tratar pacientes con FQ utilizando esta metodología (37). Con respecto al tratamiento del enfisema familiar, ya existen protocolos clínicos en los que se administra el gen deficiente (AAT) por lipofección, vía nasal (15).

#### ***Hígado***

La relativa facilidad de acceso hepático *in vivo*, o la posibilidad de transducción *in vitro* de hepatocitos obtenidos quirúrgicamente, ha posibilitado que se ensayen diversas terapias génicas para el tratamiento de enfermedades hepáticas tanto hereditarias como adquiridas. Se han desarrollado protocolos para el tratamiento de hepatitis B (38) y de tumores hepáticos (39). Dentro de las enfermedades de herencia monogénica, algunos pacientes con hipercolesterolemia familiar, patología debida a una deficiencia en el receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), han entrado en protocolos clínicos de terapia génica. Los hepatocitos de los pacientes, obtenidos por hepatectomía parcial, se transducen *ex vivo* con el ADN del receptor de LDL (40).

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y la identificación y clonado de numerosos genes, principalmente durante la última década, hicieron posible convertir en realidad lo que parecía una fantasía: utilizar el ADN como un producto farmacéutico convencional. Es así que la terapia génica, que era hasta hace poco solo una elucubración teórica, es en la actualidad una nueva modalidad terapéutica que está siendo probada en varias enfermedades, tanto genéticas como adquiridas. Esta novedosa metodología puede llegar a tener profundas implicancias en la forma en que se traten las enfermedades en el futuro.

Sin embargo todavía resta mucho camino por andar. Se tendrá que obtener un mejoramiento substancial de los sistemas vectores y de las tecnologías relacionadas con ellos. También será necesario evitar la toxicidad y las actividades inespecíficas y, por otro lado, aumentar la intensidad y duración del efecto deseado, sea este la expresión o anulación de la expresión de un gen determinado. Una vez logrado todo lo anterior, se tendrá que demostrar que lo que funcionó a la perfección en un sistema animal, también puede lograrse en un ser humano.

El sendero a recorrer parece largo y difícil pero, sin lugar a dudas, la conjunción del tiempo con el esfuerzo científico que se está llevando a cabo en numerosos grupos de investigación de todo el mundo, llevará, en un futuro cercano, a la aplicación clínica de esta nueva modalidad terapéutica en patologías de muy diversa índole.

### **REFERENCIAS**

- 1) Wiley Journal of Gene Medicine. Sitio web [www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)
- 2) Wadman M, NIH under fire over gene-therapy trials. *Nature* 403: 237, 2000

- 3) Vile R, Russell SJ. Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1: 88-98, 1994.
- 4) Kouraklis G. Progress in Cancer Gene Therapy. *Acta Oncologica* 38: 675-683, 1999
- 5) Yang Y, Nunes FA, Berenesi K y col. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4407-11, 1994
- 6) Shi FS, Weber S, Gan J y col. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM.CSF. *Cancer Gene Ther* 6: 81-88, 1999.
- 7) Visse E, Siesjö, Widegren B, Sjögren HO. Regression of intracerebral rat glioma isografts by therapeutic subcutaneous immunization with interferon- $\gamma$ , interleukin-7 or B7-1-transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther* 6: 37-44, 1999
- 8) Jantscheff P, Bongartz G, Dietrich PY y col. Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 75: B31 (98), 1997.
- 9) Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 5: 153-164, 1994.
- 10) Moller P, Sun Y, Dorbic T y col. Vaccination with IL-7 gene-modified autologous melanoma cells can enhance the anti-melanoma lytic activity in peripheral blood of patients with a good clinical performance status: a clinical phase I study. *Br J Cancer* 77: 1907-19016, 1998.
- 11) Nabel GJ, Fox BA, Post L y col. A molecular genetic intervention for AIDS-effects of a transdominant negative form of Rev. *Hum Gene Ther* 5: 79-92, 1994.
- 12) Stopeck AT, Hersh EM, Apkoriaye ET y col. Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 15: 341-349, 1997.
- 13) Richards CA, Austin EA, Huber BE. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosin deaminase for tumor specific gene therapy. *Hum Gene Ther* 6: 881-893, 1995.
- 14) Ledda MF, Adris S, Bravo AI y col. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Medicine* 3: 171-176, 1997.
- 15) Brigham KL, Lane KB, Meyrick B y col. Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy. *Hum Gene Ther* 11: 1023-1032, 2000.

- 16) Parkman R, Weinberg K, Crooks G y col. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Annu Rev Med* 51: 33-47, 2000.
- 17) Schneider H, Adebakin S, Themis M y col. Therapeutic plasma concentrations of human factor IX in mice after gene delivery into the amniotic cavity: a model for the prenatal treatment of haemophilia B. *J Gene Med* 1: 424-432, 1999.
- 18) Weber F, Bojar H, Piesack HB y col. Gene therapy of glioblastoma – one year clinical experience with ten patients. *J Mol Med* 75: B40 (126), 1997
- 19) Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y y col. *In vivo* efficacy, and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Ther* 7: 74-82, 2000.
- 20) Tait DL, Obermiller PS, Hatmaker AR y col. Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin Cancer Res* 5: 1708-1714, 1999.
- 21) Roth JA, Swisher SG, Merritt JA y col. Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Semin Oncol* 25: 33-37, 1998.
- 22) Rochlitz CF, Janstcheff P, Bongartz G y col. Gene therapy with cytokine-transfected xenogeneic cells in metastatic tumors. *Adv Exp Med Biol* 451: 531-537, 1998.
- 23) Aruga, A, Tanigawa K, Aruga E y col. Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Ther* 6: 89-95, 1999.
- 24) Hombach A, Koch D, Sircar R y col. A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther* 6: 300-304, 1999.
- 25) Ribas A, Butterfield LH, McBride WH y col. Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 6: 523-536, 1999.
- 26) Kanai F, Lan KH, Shiratori Y y col. *In vivo* gene therapy for  $\alpha$ fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of Cytosine Deaminase gene. *Cancer Res* 57: 461-465, 1997.
- 27) Habib NA, Ding SF, el-Masry R y col. Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas *Cancer Detect Prev* 20: 103-107, 1996.

- 28) Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Nicolaides NC. Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4504-4508, 1994.
- 29) Cowan KH, Moscow JA, Huang H, y col. Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5:1619-1628, 1999.
- 30) Mathisen PM, Tuohy VK. Gene therapy in the treatment of autoimmune disease. *Immunol Today* 19: 103-105, 1998.
- 31) Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med* 178: 175-185, 1993.
- 32) Moritani M, Yoshimoto K, Ii S y col. Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific Th1 lymphocytes. A gene therapy model for autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 98: 1851-1859, 1996.
- 33) Romano G, Michell P, Pacilio C y col. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18: 19-39, 2000.
- 34) Nabel GJ, Fox BA, Post L y col. A molecular genetic intervention for AIDS-effects of a transdominant negative form of Rev. *Hum Gene Ther* 5: 79-92, 1994.
- 35) Kitajima I, Hanyu N, Kawahara K y col. Ribozyme-based gene cleavage approach to chronic arthritis associated with human T cell leukemia virus type I: induction of apoptosis in synoviocytes by ablation of HTLV-I tax protein. *Arthritis Rheum* 40:2118-2127, 1997.
- 36) Chen SY, Bagley J, Marasco WA. Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther* 5: 595-601, 1994.
- 37) Allo JC, Midoux P, Merten M y col. Efficient gene transfer into human normal and cystic fibrosis tracheal gland serous cells with synthetic vectors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:166-75, 2000.
- 38) Aurisicchio L, Delmastro P, Salucci V y col. Liver-specific alpha 2 interferon gene expression results in protection from induced hepatitis. *J Virol* 74:4816-4823, 2000.
- 39) Drozdik M, Qian C, Xie X y col. Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 32:279-286, 2000.

- 40) Raper SE, Grossman M, Rader DJ y col. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg* 223:116-126, 1996.

Tabla N° 1. Protocolos de terapia génica por continente\*

CONTINENTE	PROTOCOLOS		PACIENTES	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
<b>América</b>	<b>418</b>	<b>78.3</b>	<b>2208</b>	<b>63.7</b>
<b>Europa</b>	<b>99</b>	<b>18.5</b>	<b>898</b>	<b>25.9</b>
<b>Asia</b>	<b>9</b>	<b>1.7</b>	<b>32</b>	<b>0.9</b>
<b>Australia</b>	<b>3</b>	<b>0.6</b>	<b>13</b>	<b>0.4</b>
<b>Africa</b>	<b>1</b>	<b>0.2</b>	<b>15</b>	<b>0.4</b>
<b>Multi-continente</b>	<b>4</b>	<b>0.7</b>	<b>298</b>	<b>8.6</b>
<b>Total</b>	<b>534</b>	<b>100</b>	<b>3464</b>	<b>100</b>

\* Reproducido con permiso de Wiley Journal of Gene Medicine sitio web <http://www.wiley.co.uk/genmed>

Tabla N° 2. Protocolos de terapia génica por tipo de indicación\*

CATEGORÍA	PROTOCOLOS		PACIENTES	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
<b>Cáncer</b>	<b>333</b>	<b>62.4</b>	<b>2389</b>	<b>69</b>
<b>Enfermedades monogénicas</b>	<b>71</b>	<b>13.3</b>	<b>309</b>	<b>8.9</b>
<b>Enfermedades infecciosas</b>	<b>36</b>	<b>6.7</b>	<b>408</b>	<b>11.8</b>
<b>Enfermedades vasculares</b>	<b>36</b>	<b>6.7</b>	<b>59</b>	<b>1.7</b>
<b>Otras enfermedades</b>	<b>8</b>	<b>1.5</b>	<b>19</b>	<b>0.5</b>
<b>Marcación génica</b>	<b>48</b>	<b>9</b>	<b>274</b>	<b>7.9</b>
<b>Voluntarios sanos</b>	<b>2</b>	<b>0.4</b>	<b>6</b>	<b>0.2</b>
<b>Total</b>	<b>534</b>	<b>100</b>	<b>3464</b>	<b>100</b>

\* Reproducido con permiso de Wiley Journal of Gene Medicine sitio web <http://www.wiley.co.uk/genmed>