

TERAPIA GENICA

Roser Gonzalez Duarte
Departamento de Genetica, Facultad de Ciencias, Universidad de
Barcelona.

INTRODUCCION

El desarrollo de la tecnologia de la Ingenieria Genetica, junto con los avances conceptuales realizados en Genetica Molecular, Biologia Celular y Genetica Humana estan revolucionando el campo de la terapeutica de las enfermedades hereditarias humanas. La causa comun de todas ellas es una alteracion en el material hereditario y, por tanto, la substitucion del gen defectivo por su equivalente funcional se presenta como la via idonea para eliminar globalmente los efectos metabolicos y alteraciones clinicas que acompanan a la mayor parte de dichas enfermedades. El acceso directo al gen, la transferencia a un medio exogeno, la insercion en un genoma receptor y la regulacion de su expresion constituyen sin duda, los requisitos previos de esta terapeutica "ideal". Es cierto que en los ultimos diez años se ha avanzado mucho en genetica humana. Continuamente se aislan y caracterizan nuevos genes, se identifican nuevos loci, se incrementa exponencialmente el numero de marcadores cromosomicos, puntos de referencia basicos para el cartografiado fisico y genetico del genoma humano. Sin embargo, aun queda mucho camino por recorrer. Las bases bioquimicas de muchas enfermedades hereditarias son aun hoy poco claras, el control de la expresion de un gen fuera de su entorno es problematica y tampoco disponemos de los conocimientos suficientes para garantizar la supervivencia y replicacion de las celulas transfectadas transferidas al organismo huésped.

Existen en la actualidad dos grandes tipos de terapia genica: la terapia de celulas germinales y la de celulas somaticas. La primera ha sido desarrollada en animales. Consiste en introducir un gen exogeno en una celula huevo, obtener un organismo transgenico y a partir de el una linea pura que exprese de forma estable el producto genico. Las razones que impiden su aplicacion al hombre son obvias: unas de indole etico; las otras, los enormes problemas tecnicos, aun hoy insoslayables, asociados a esta tecnologia. Queda asi como unica opcion la terapia de celulas somaticas, se preserva el reservorio genetico de la especie y solo se pretende obviar los efectos metabolicos asociados a un defecto genetico determinado en un individuo afecto. Los genes candidatos para la transferencia son aquellos que ya han sido clonados y caracterizados y que estan claramente asociados a una sintomatologia clinica definida. Tambien se conocen transtornos de origen multigenico pero su terapia es aun hoy inabordable por la complejidad genetica y tecnologica inherente a los mismos.

VECTORES

Los vectores mas utilizados para la transferencia de genes a celulas somaticas son los retrovirus. Estos virus de RNA tienen un ciclo biologico caracteristico que los hace especialmente aptos para introducir secuencias de DNA exogeno en el genoma receptor.

Un paso obligado despues de la infeccion es la retrotranscripcion del RNA genomico e insercion del DNA provirico en una localizacion cromosomica. A partir del provirus se sintetizara el nuevo RNA genomico asi como las proteinas virales que daran lugar a los nuevos viriones infectivos. Para el empaquetamiento del RNA genomico es esencial la secuencia Y, localizada en posicion 3+ respecto al extremo izquierdo del provirus (LTR). Entre las proteinas codificadas por el virus, env, es la responsable del tropismo del virus.

Se dispone hoy de lineas celulares de mamiferos que han incorporado en su genoma formas proviricas mutantes y que son productores eficaces de proteinas virales. La delecion de Y impide que el producto de transcripcion del provirus se empaquete y una mutacion en env amplia el margen de posibles huespedes. Cuando estas lineas celulares son transfectadas con un DNA recombinante que contiene el gen terapeutico humano y los extremos de un genoma provirico silvestre, son capaces de dirigir la sintesis de viriones descendientes defectivos para la replicacion pero totalmente aptos para el proceso infectivo.

CELULAS DIANA

Aunque los retrovirus recombinantes pueden infectar muchos tipos de celulas, solo algunas seran capaces de resistir los procesos de manipulacion y transferencia al huesped y de expresar de forma estable los genes insertados. Las celulas madre de la sangre, los linfocitos, fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos y mioblastos han sido las mas utilizadas. El sistema hematopoiético contiene celulas totipotentes, celulas madre, capaces de generar todos los tipos celulares del linaje linfoide y micloide y son susceptibles de ser infectadas por retrovirus. Por otra parte, los transplantes de medula osea han permitido acumular una gran experiencia sobre la manipulacion de estas celulas. Los primeros experimentos realizados en lineas celulares murinas son esperanzadores, ya que despues de la infeccion de celulas madre con retrovirus recombinantes y posterior reimplantacion en un huesped se ha podido detectar expresion del gen terapeutico en diversos tipos celulares en sangre periferica. Sin embargo las limitaciones tecnicas para la aplicacion de esta terapia son aun hoy importantes. De la medula osea de un paciente se pueden obtener del orden de 10¹⁰ celulas, pero solo 10⁷-10⁸ seran celulas madre. Estas, a su vez, son dificiles de aislar. El proceso de infeccion es ademas poco eficaz, porque algunas celulas se lesionan durante la manipulacion y otras, al ser celulas que se dividen poco, son resistentes a la infeccion.

El primer experimento de terapia humana se inicio en Septiembre de 1990, cuando se transfundieron alrededor de 1 billon de linfocitos que habian incorporado el gen de la adenosina desaminasa (ADA) a una nin~a de 4 años afecta de inmunodeficiencia combinada severa (SCID); una enfermedad hereditaria grave debida a una deficiente capacidad de adhesion y movilizacion de los linfocitos. El tratamiento ha sido un exito ya que la paciente tratada ha recuperado temporalmente la funcionalidad del sistema inmunitario. Pero esta mejora es solo temporal, los linfocitos ADA mueren y deben ser substituidos. Con posterioridad el NIH ha aprobado la utilizacion de celulas madre de la sangre como celulas diana para la insercion de ADA en nuevos pacientes. El equipo de la Johns Hopkins University que ya realizo la primera terapia de ADA podra ahora proceder a la modificacion genetica de estas celulas y verificar si, como seria de esperar, se obtiene expresion a mas largo plazo.

TRANSFERENCIA GENICA DIRIGIDA

Un problema inherente a la introduccion de genes exogenos en celulas huesped es la regulacion de la expresion del material genetico transferido. La infeccion con retrovirus recombinantes garantiza la integracion del gen terapeutico en una localizacion cromosomica impredecible. La estructura de la cromatina, las sen~ales de regulacion presentes en la region de insercion y la interaccion entre estas y las del gen insertado pueden afectar considerablemente su expresion. En muchos tratamientos terapeuticos se requiere un nivel de expresion minimo y una especificidad tisular para corregir adecuadamente el defecto genetico. Dosis insuficientes o expresion en otros tejidos puede comportar un grado de disfuncionalidad y letalidad que hay que tratar de evitar. Se han logrado incorporar secuencias de DNA exogenas por recombinacion homologa en el lugar correspondiente del cromosoma receptor (gene targeting). Ese fenomeno ha sido descrito en celulas madre embrionarias murinas (ES) y en diversas lineas celulares de mamiferos. En estos experimentos la maquinaria recombinacional de la celula huesped dirige la integracion por recombinacion conservativa, o no conservativa, del gen terapeutico, si bien, procesos de recombinacion no-homologa concurren paralelamente. Asi, es necesario disponer de un buen sistema de seleccion que nos permita enriquecer el cultivo con las celulas que han incorporado la secuencia exogena en la region cromosomica homologa. Un marcador adecuado para este proceso de seleccion es el gen de la timidina-quinasa (tk) del virus del Herpes Simplex (HSV), que codifica para una enzima capaz de transformar el ganciclovir en un producto letal para la celula, mientras que este mismo producto no afecta la viabilidad de las celulas huesped. En los casos de recombinacion homologa no deberia insertarse el gen HSV-tk, mientras que en una integracion al azar esperamos que el vector se incorpore en su totalidad y por tanto la celula, (HSV) -tk, adquirira sensibilidad al ganciclovir .

Este tipo de estrategia es muy prometedora y sin duda tendra aplicacion en los tratamientos terapeuticos. La substitucion de un gen defectivo endogeno por uno funcional y en el mismo lugar cromosomico presenta, sin duda, ventajas obvias respecto la integracion al azar y minimiza considerablemente los problemas inherentes a su expresion. Es por ello que la denominada transferencia dirigida de genes se prevee como una herramienta esencial en la terapia de futuro.

TRANSFERENCIA DE GENES IN VIVO

La estrategia de correccion de errores por introduccion directa del gen en el organo adecuado in vivo en contraposicion a la transferencia de genes a celulas en cultivo y reimplantacion posterior de las celulas transfectadas, se presenta como aun mas atractiva. Experimentos realizados recientemente con diversas especies de mamiferos, ilustran la potencialidad y versatilidad de la transferencia de genes in vivo . En uno de ellos, se introdujeron con la ayuda de un cateter, celulas endoteliales transformadas con un gen marcador, β -gal, en la arteria femoral de una hembra porcina de la cepa de Yucatan. Las preparaciones microscopicas de secciones arteriales incubadas con el cromogeno X-gal revelaron la presencia de actividad β -galactosidasa en una

proporcion elevada de las celulas endoteliales transferidas fijadas a la pared arterial. Como ya es sabido las celulas endoteliales inducen la proliferacion de la musculatura lisa y regulan el tono muscular de los vasos sanguineos. La implantacion de celulas endoteliales sanas podria subsanar las lesiones de los procesos trombogenicos asi como otras alteraciones vasculares. Al mismo tiempo servirian como fuente productora de agentes angiogenicos, antitromboliticos o factores de crecimiento, para tratar alteraciones geneticas o sistemicas debidas a deficiencias de productos geneticos en el torrente circulatorio.

Tambien se han descrito experimentos con ratones mutantes mdx inyectados intramuscularmente con diversas construcciones geneticas. El efecto de la mutacion mdx (distrofina-deficiente) en raton es equivalente a la del gen de la distrofia muscular (DMD) humano. Se construyeron plasmidos recombinantes con el gen DMD humano y se inyectaron directamente en musculo esqueletico y cardiaco de ratones mutantes. Se ha demostrado que la expresion de los genes transferidos era estable durante meses y que el plasmido se mantenia circular y episomico en el contexto no replicativo de la fibra muscular. Sin embargo, el nivel de expresion ha resultado ser excesivamente bajo, ya que para producir un efecto terapeutico el producto deberia estar presente a concentraciones del orden de 10 a 50 veces mas elevadas.

Un tratamiento terapeutico imaginativo descrito muy recientemente se basa en el uso de liposomas como agentes transmisores de genes funcionales a celulas pulmonares de conejo. Estos globulos grasos, tan utilizados en cosmetica como agentes hidratantes, han sido ya utilizados para el suministro especifico de farmacos y podrian ser muy utiles para la terapia de algunas enfermedades pulmonares. El suministro es extremadamente sencillo porque se realiza en forma de aerosol y va directamente dirigido a las celulas afectadas.

Tambien se han disenado experimentos con nuevos vectores. Los adenovirus, a diferencia de los retrovirus antes senalados, son capaces de infectar celulas que presentan una tasa baja de multiplicacion. Adenovirus defectivos recombinantes conteniendo el gen de la α 1-antitripsina (α 1AT) o el de la fibrosis quistica (CF) han sido inyectados en la traquea de ratones defectivos. Los productos correspondientes a los genes transferidos, no solo han sido detectados en el epitelio pulmonar sino tambien en los fluidos extracelulares. El nivel de expresion, aunque bajo, es aceptable, Sin embargo este tipo de vector no podria ser utilizado en humanos sin antes resolver los problemas relacionados con su patogenicidad potencial.

La terapia genica esta en pleno desarrollo. Muy posiblemente, en un futuro proximo podremos aplicarla de forma tan rutinaria como la convencional para paliar los efectos de enfermedades hereditarias frecuentes en la poblacion humana.

Literatura citada

Capecchi, M. R. 1989. The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting. TIG 5, 70-76.

Cournoyer, D. Scarpa, M. y Caskey C. T. 1990. Gene Therapy. Current Opinion in Biotechnology 1, 196-208

Hoffman, M. 1991. New Vector Delivers Genes to Lung Cells. Science 252, 374.

Nabel, E. G., Plautz, G., Boyce, F. M., Stanley, J. C. y Nabel, G. J. 1989. Recombinant Gene Expression in Vivo Within Endothelial Cells of the Arterial Wall. *Science* 244, 1342-1344.

Partridge, T. A. 1991. Muscle Transfection Made Easy. *Nature* 352, 757-758.

Verma, I. M. 1991. Terapia Genica. *Investigacion y Ciencia* 172, 24-32.

Verma, I. M. y Naviaux, R. K. 1991. Human Gene Therapy. *Current Opinion in Biotechnology* 1, 54-59.