

Vectores virales en terapia génica. Ventajas de los vectores adenoasociados

Q.F.B. Ana Soledad Sandoval Rodríguez,* D. en C. Adriana María Salazar Montes,*
D. en C. Juan Armendáriz-Borunda*

* Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica. CUCS. Universidad de Guadalajara CA-77.

Correspondencia: Dr. Juan Armendáriz-Borunda. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica. CUCS. Universidad de Guadalajara. Apdo. postal 2-123, Guadalajara, Jal., México C.P. 44281. Teléfono/fax: (33) 3617-4159; (33) 3618-7473. Correo electrónico: armendbo@cucs.udg.mx

Recibido para publicación: 15 de marzo de 2004.

Aceptado para publicación: 22 de febrero de 2005.

RESUMEN. La terapia génica se ha visto favorecida por el desarrollo de un número cada vez mayor de vectores, con el fin de lograr una expresión más persistente y una administración inocua. Dentro de los vectores virales los adenoasociados presentan ventajas prometedoras. Este virus de ADN es capaz de transducir gran variedad de líneas celulares, integrarse al genoma del huésped y lograr expresiones persistentes del transgén por lapso de meses, todo esto sin generar una respuesta inmune celular. La aplicación de nuevas metodologías en la producción y purificación de estos vectores ha mejorado considerablemente la cantidad y calidad de partículas infecciosas que se generan. En este momento, gracias a los mencionados desarrollos biotecnológicos, la terapia génica es una opción terapéutica viable para varias enfermedades crónico-degenerativas.

Palabras clave: adenoasociados, terapia génica, vectores virales, parvovirus, virus.

SUMMARY. Gene therapy has evolved due to the development of a number of biotechnology weapons, i.e., vectors that achieve for a longer expression and safer administration. Among viral vectors developed adeno-associated virus have shown promising advantages. These DNA viruses transduce a wide cell range, can integrate in host's genome and achieve for a long-period expression, besides avoiding a cellular immune response. The new technologies applied to the production and purification of these vectors had resulted in notable increases in quantity and quality of the infectious particles obtained. Actually, due to biotechnological advances, gene therapy is a potential therapeutic option.

Key words: Adeno-associated virus, gene therapy, viral vectors, parvovirus, virus.

INTRODUCCIÓN

La terapia génica en los últimos años se ha enfocado a la búsqueda de nuevos vectores para el transporte de genes, los cuales tengan una mayor eficacia en la transferencia génica, mayor persistencia en la expresión del material transferido, así como una alta especificidad al tipo celular que se desea transferir. Una de las características más importantes es que deben ser seguros e inocuos, que despierten en el paciente una respuesta inmune casi nula.

En la búsqueda de los vectores más adecuados se han utilizado diferentes especies de virus cada uno con características específicas.

RETROVIRUS

Los retrovirus son un grupo ampliamente desarrollado. Son virus cuyo material genético está constituido por una molécula de ARN. Esto los obliga a realizar el proceso de retrotranscripción para su replicación. Tienen la capacidad de integrarse en el genoma del huésped, con lo que ofrecen la ventaja de una expresión persistente del transgén, lo que los hace útiles para su uso en enfermedades hereditarias y/o crónicas. Sin embargo, la integración en el genoma del huésped es aleatoria, presentando el riesgo (aunque extremadamente bajo) de mutagénesis insercional debido a la posibilidad de alterar un gen vital o un gen supresor de tumor y por lo tanto

interrumpir su expresión, o bien insertarse en un proto-oncogén induciendo su activación a oncogén. La gran desventaja que presenta este tipo de vectores es que sólo son capaces de infectar células en división. Los retrovirus recombinantes más usados son los derivados del virus de la leucemia murina, los cuales se modifican para hacerlos deficientes de replicación, con lo que se suprime su capacidad de formar partículas virales.¹

LENTIVIRUS

Son un tipo de retrovirus con capacidad de integración estable tanto en células en reposo como en división.¹ Sin embargo, la mayoría de ellos derivan de la familia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que los aspectos referentes a la seguridad biológica para su uso en protocolos clínicos deberán ser considerados antes de su aplicación.

ADENOVIRUS

Los adenovirus (Ad) son virus de ADN ampliamente desarrollados en terapia génica; su aislamiento en 1953 a partir de tejidos adenoides de niños dio origen a su nombre.² A los adenovirus recombinantes usados como vectores se les han eliminado regiones de su genoma con la finalidad de inhibir su replicación. Debido a que no se integran en el genoma del huésped, estos virus sólo expresan el transgén en forma temporal durante su estancia en la célula. Los adenovirus deben su uso exitoso al hecho de su seguridad biológica, porque en forma natural en el humano sólo se les ha relacionado con padecimientos de vías respiratorias. Existen más de 40 serotipos de adenovirus, de los cuales los tipos 2 y 5 (Ad2 y Ad5) son los más utilizados como vectores génicos.³ Su producción es relativamente sencilla, lo que ha facilitado una administración eficiente *in vivo*. Estos virus tienen además la capacidad de infectar un amplio espectro de células eucariotas, tanto en reposo como en replicación,⁴ siendo su principal órgano blanco el hígado (cuando es administrado por vía sistémica), en el cual logra transducciones de 80-90% en hígados de rata sanos y alrededor de 40% en hígados cirróticos por el modelo de intoxicación por CCl₄.⁵ El principal inconveniente para su utilización en el envío de genes a órganos o tejidos específicos, es la vigorosa respuesta inmunológica que despiertan, caracterizada por una intensa inflamación, así como por activación de linfocitos T citotóxicos.⁶ En un intento por aminorar la intensidad de la respuesta inmune despertada en el huésped por el ade-

novirus se han escindido extensas porciones en el genoma viral produciendo así los llamados adenovirus *gut-less* que expresan menos proteínas virales; despertando por ende una menor respuesta inmunológica.⁷

ADENOASOCIADOS

En los últimos años la tecnología de la terapia génica se ha centrado en el desarrollo y estudio de los virus adenoasociados (AAV) que reciben este nombre debido a que se les detectó por primera vez como contaminantes en preparaciones de adenovirus. Su asociación con los Ad se debe al hecho de que son defectuosos en replicación, y dependen de un virus colaborador (un Ad o un herpes virus) que proporcione las proteínas necesarias para tener dicha función.⁸ Pertenecen a la familia parvoviridae y son del género dependovirus. Su genoma está constituido por una cadena sencilla de ADN (positiva o negativa) de 4,680 nucleótidos de longitud. Su genoma es muy sencillo y codifica solamente para dos genes: REP y CAP,⁹ los cuales son sustituidos por el promotor y transgén deseado al hacerlos recombinantes (*Figura 1*). La longitud mínima aceptada para estos constructos es de 1 Kb y la máxima la del genoma nativo (4.7 Kb); porque constructos de un tamaño mayor no mantienen una función óptima de empaquetamiento. El marco de lectura abierta del gen REP (replicación) codifica para varias proteínas sobrepuestas como la Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78 involucradas en la transcripción, replicación e integración del genoma, respectivamente.¹⁰

El gen CAP (cápside) codifica para las proteínas que conforman la cápside del virión, conocidas como VP1 (87 Kd), VP2 (73 Kd) y VP3 (62 Kd), las cuales interactúan con los receptores y correceptores celulares para la internalización a través de una endocitosis mediada por receptor y para el transporte del virión al núcleo celular.¹¹ El marco de lectura abierta del genoma del AAV está flanqueado por dos secuencias terminales llamadas ITR's (por sus siglas en inglés) de 145 nucleótidos, de los cuales 125 forman una estructura secundaria de horquilla tipo "T" al tener secuencia palindrómica. Los ITR's funcionan como *primers* para la replicación del ADN y la formación de la doble cadena, además mantienen la integridad de los extremos, y en estas regiones se localizan las secuencias que le permiten la recombinación con el ADN del huésped.¹² El virión del AAV no contiene proteínas de envoltura y su ADN sólo se encuentra rodeado por las proteínas de la cápside, las cuales conforman una estructura icosaédrica con tamaño de 18-26

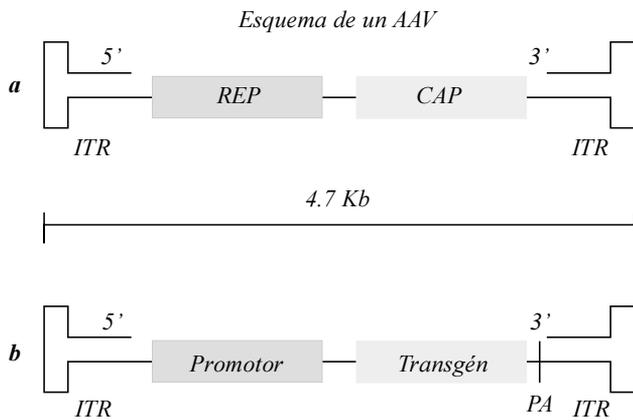


Figura 1. a) Los adenoasociados silvestres están constituidos por los genes *rep* y *cap*. **b)** En el AAV recombinante estos genes son sustituidos por el promotor y el transgén deseado, llegando a una longitud máxima de 4.7 Kb como el genoma nativo. Las secuencias ITR necesarias para el empaquetamiento e integración se conservan intactas.

nm. Las diferencias antigénicas en las proteínas capsídicas dan lugar a los seis serotipos del AAV conocidos hasta el momento, de los cuales el serotipo dos (AAV2) es el que se ha desarrollado en la terapia génica haciéndolo recombinante.¹³ Parece ser que según el serotipo existe una diferencia en el tropismo a diferentes tejidos. Por ejemplo; en el tejido neuronal el AAV2 exclusivamente transduce neuronas, mientras el AAV5 transduce de 130-3,000 veces más células (neuronas y astrocitos) que el AAV2, y el AAV4 sólo transduce células del epéndimo.^{14,15}

En el *cuadro 1* se resumen las principales ventajas y desventajas de los vectores biológicos utilizados en la terapia génica.

RESPUESTA INMUNE

Hasta el momento no se ha documentado ningún padecimiento asociado con la infección de AAV en humanos; sin embargo, se estima que hasta 80-90% de la población adulta a nivel mundial es seropositiva a los AAV, mayormente al serotipo AAV2. Sin embargo, esta inmunidad es incompleta porque sólo 8% de los humanos expuestos han desarrollado anticuerpos neutralizantes, lo que plantea la posibilidad de que los humanos sean susceptibles de una reinfección en forma natural.¹⁶ No obstante, con la finalidad de utilizarlo en futuros protocolos de terapia génica se han planteado diversas alternativas en caso de requerirse una readministración de rAAV; como lo es la elaboración de un rAAV2 con proteínas de cápside modificadas o el uso de un rAAV de serotipo alternativo (el AAV1, entre otros).¹⁷

Por otro lado, el título de anticuerpos neutralizantes que se desarrollan depende en gran medida de la naturaleza del transgén, la ruta y vía de administración, el tejido administrado, el grado de contaminación de la preparación con el virus colaborador o sus proteínas, así como el estado de salud del hospedero. La administración de AAV en diversos tejidos estudiados no despierta respuesta inmune celular. Se cree que podría deberse a que las células presentadoras de antígeno de la mayoría de los tejidos no son transducidas por los AAV, por lo que no expresan el producto del transgén ni proliferan en respuesta al estímulo antigénico, por lo que no se genera respuesta inmune celular.

CUADRO 1
CARACTERÍSTICAS DE LOS VECTORES BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN TERAPIA GÉNICA

Vector	Tamaño	Ventajas	Desventajas
AAV	45-60 nm	Expresión persistente Transduce gran variedad de células Evade respuesta inmune celular	Tamaño limitado del transgén Producción en títulos bajos
Ad	90-110 nm	No se integra Capacidad para genes grandes Transduce células en reposo o replicación Elevada eficiencia de transducción	Elevada respuesta inmune Tropismo preferente a hígado Expresión temporal Administración única
Retrovirus	123-145 nm	Capacidad para genes grandes Expresión estable Producción en altos títulos	Transduce sólo células en división Se integra aleatoriamente

CICLO VIRAL

El ciclo viral de los AAV puede optar por la fase de latencia o bien la fase de replicación. Si las condiciones celulares son favorables (coinfeción celular con un adenovirus, o mecanismos celulares de reparación de ADN activados) se favorece la formación de la doble cadena y el ciclo lítico. En este mecanismo se aprovecha la maquinaria enzimática celular de replicación del ADN y se producen las proteínas necesarias para la generación de la progenie (en el caso de los rAAV se produce la proteína terapéutica). Por otro lado, se puede llevar a cabo el ciclo de integración, donde el ADN del AAV se recombina con el genoma del huésped, permaneciendo en forma latente hasta una reactivación posterior, ocasionada por los mismos mecanismos que favorecen el ciclo lítico (Figura 2).

INTEGRACIÓN

En forma silvestre, los AAV se integran preferentemente (60-70%) en el cromosoma 19 de humano, en el brazo largo sitio 13.3-4.¹⁷ Las proteínas Rep68 y Rep78 reconocen una secuencia de unión en la horquilla del AAV llamada sitio **API**, el cual es una secuencia repetitiva GCTC. Asimismo, en el cromosoma 19 en el sitio específico de integración del adenoasociado se localiza una secuencia muy similar de GCTC repetitivos conocida como loci AAVS1. AAVS1 y API forman un complejo con las proteínas Rep68/78 que con su actividad helicasa y endonucleasa sitio-específica facilitan la recombinación para llevar a cabo la integración.¹⁰ Los rAAV pierden la característica de integración sitio-específica al no producir las proteínas Rep; sin embargo, una ingeniosa estrategia se ha desarrollado donde el promotor p5 que controla las proteínas Rep 68/78 es situado corriente abajo de la secuencia codificadora Rep; con esta configuración la expresión de Rep se silencia, sin embargo, al formar estructuras circulares, la proteína Rep se expresará facilitando la integración específica en el cromosoma 19, lo que dará lugar a la linearización y detendrá la expresión de la proteína.¹⁸

TRANSDUCCIÓN

La mayoría de los vectores virales transducen las células en un lapso de horas, sin embargo, los AAV requieren de varios días a semanas antes de que el vector alcance la forma transcripcionalmente activa en las células infectadas.

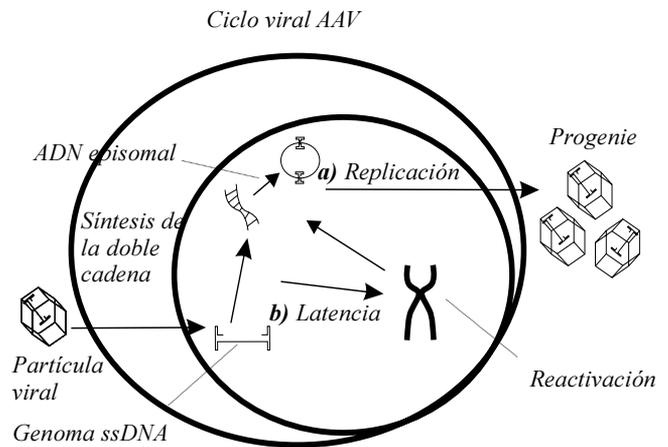


Figura 2. El ciclo viral de los adenoasociados puede tomar la fase lítica o de integración. **a)** Después de la liberación del ADN del adenoasociado se lleva a cabo la síntesis de la doble cadena, este ADN puede quedar en forma episomal como estructura de concatámero y expresar sus proteínas generando progenie. **b)** En la fase de latencia el adenoasociado después de su entrada a la célula pasa a integrarse en el genoma del huésped, quedando en un estado latente hasta que un daño al ADN celular o una infección de un adenovirus o virus herpes reactivan al adenoasociado llevándolo a expresar sus proteínas y entrar al estado de replicación.

En modelos animales de murinos y primates el porcentaje máximo de transducción para la mayoría de las células se presenta entre las seis y 10 semanas,^{19,20} manteniéndose la expresión del transgén constante a partir de ese momento y hasta por aproximadamente dos años.²¹ La eficacia de transducción varía dependiendo del promotor, del tejido transducido y de la vía de administración. Algunos investigadores reportan que la transducción del rAAV se ve favorecida si la célula se encuentra en el estadio S del ciclo celular.²² Este fenómeno se ha observado en células musculares, sin embargo, en otro tipo de células como las hepáticas no se presentan un efecto similar.²³

El proceso de transducción comienza con el reconocimiento de la célula por parte del rAAV. Este reconocimiento se realiza mediante un receptor ubicuo asociado a membrana de heparan sulfato, un proteoglicano que parece mediar la adhesión del virión a la membrana celular y el proceso de infección.²⁴ La internalización del AAV se ve favorecida por la $\alpha V\beta 5$ integrina y el receptor tipo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1) que actúan como correceptores en algunos tipos particulares de células.^{25,26} El AAV escapa del fagolisosoma y llega al núcleo por mecanismos aún desconocidos. Una vez en el núcleo el paso limitante en el proceso de transducción es la síntesis de la doble cadena.²⁷ Una proteína producida por la célula huésped llamada ssD-BP (pro-

teína de unión a la secuencia D) interactúa de manera preferentemente con la secuencia D(-) localizada en el ITR 3' del rAAV formando un complejo que bloquea el inicio de la replicación del ADN viral desde su extremo OH 3'. Esta proteína se encuentra fosforilada en sus residuos de tirosina por la actividad de tirosina cinasa del receptor al factor de crecimiento epidermal celular y en este estado es capaz de inhibir la síntesis de la segunda cadena del rAAV.²⁸ Sin embargo, la coinfección con un Ad silvestre, el tratamiento con hidroxiaurea o con genestein (inhibidor específico de cinasas de tirosina) o inclusive la sola expresión de la proteína Ad4 Orf6 causa la defosforilación de estos residuos, y con esto un cambio conformacional de la proteína ssD-BP, con lo que extremo OH 3' queda expuesto y listo para usarse como primer (iniciador) para la síntesis del ADN viral. De esta manera se logra un incremento en la expresión del transgén e inclusive la replicación autónoma de los AAV silvestres.

La totalidad de los factores requeridos para la formación de la doble cadena de ADN no están del todo establecidos, por lo que este paso no ha podido ser completamente manipulado. Se conoce que la transducción puede ser inducida hasta 5-10 veces por diversos factores entre los que están:

1. Coinfección con un adenovirus o un plásmido que contenga la secuencia E4 Orf6.^{27,29}
2. Exposición de la célula huésped a agentes genotóxicos tales como radiación UV o γ .^{30,31}
3. Agentes tóxicos como etanol, cisplatino e hidroxiaurea.³²⁻³⁴

Aunque los rAAV transducen gran variedad de tejidos, la eficiencia de transducción varía considerablemente de un tipo celular a otro; en el caso de músculo, los porcentajes de transducción son de 10-20%;³⁵ mientras en hígado y riñón sólo se ha detectado un máximo de 5-10%.³⁶ Esta eficiencia dispar en la transducción está determinada en cierta medida por el grado de fosforilación de la proteína celular ssD-BP, así como por la abundancia en la membrana celular de los correceptores necesarios para la internalización del virión.

Una vez superada la limitante de la síntesis de la segunda cadena, el AAV puede integrarse o bien permanecer episomalmente. Cualquiera de estas opciones lleva a la transcripción del transgén y a la expresión de la proteína.

Los concatámeros son estructuras formadas por la unión cabeza-cola de dos o más rAAV a través de una recombinación en los ITR's, logrando estructuras lineales o bien circulares. Los concatámeros parecen ser la

estructura idónea de los AAV dentro de la célula infectada; y pueden encontrarse de forma integrada (lineales) o episomal (circulares) (*Figura 3*). La formación de concatámeros ha sido demostrada a través de la observación de "concatámeros híbridos" de dos diferentes tipos de rAAV, lográndose la transducción y expresión de ambas proteínas.³⁷ Los concatámeros episomales son los responsables de un alto porcentaje (~70%) de la expresión del transgén, porque la estructura circular de doble cadena es sumamente estable y es capaz de expresar la proteína, de una forma constante y por largos periodos de tiempo.³⁸

PRODUCCIÓN

Las metodologías en la producción de las partículas infecciosas de rAAV se han mejorado, las más desarrolladas son las que requieren transfección a líneas celulares. Entre las diversas metodologías utilizadas se cuentan las siguientes:

Clásica

Un cultivo de células es infectado con Ad o herpes virus, los cuales proveen al AAV las funciones de replicación en las cuales es defectuoso. Posteriormente, las células son transfectadas con un plásmido circular de ADN que contiene los genes rep y cap del AAV y con otro plásmido no homólogo con las secuencias ITR y el transgén. Después de la cosecha de los AAV, los virus colaboradores remanentes como contaminantes deben ser removidos por alguna técnica de purificación, como es HPLC, y separación por gradientes de cloruro de cesio u otra.

Transfección triple

Esta técnica se usa para eliminar la posibilidad de contaminación con AAV silvestres. Consiste en transfectar simultáneamente tres plásmidos: uno que contiene exclusivamente las secuencias de replicación del virus colaborador, otro con el vector del AAV que contiene los ITR y la secuencia del transgén y un tercero que codifica para las proteínas rep y cap necesarias para las partículas virales del AAV (*Figura 4*).

De las estrategias dependientes de líneas celulares productoras podemos mencionar las siguientes opciones:

1. Células productoras: células modificadas genéticamente para que expresen en forma estable los genes rep y cap; son infectadas con un Ad silvestre y un Ad híbrido que contiene el gen terapéutico de interés flan-

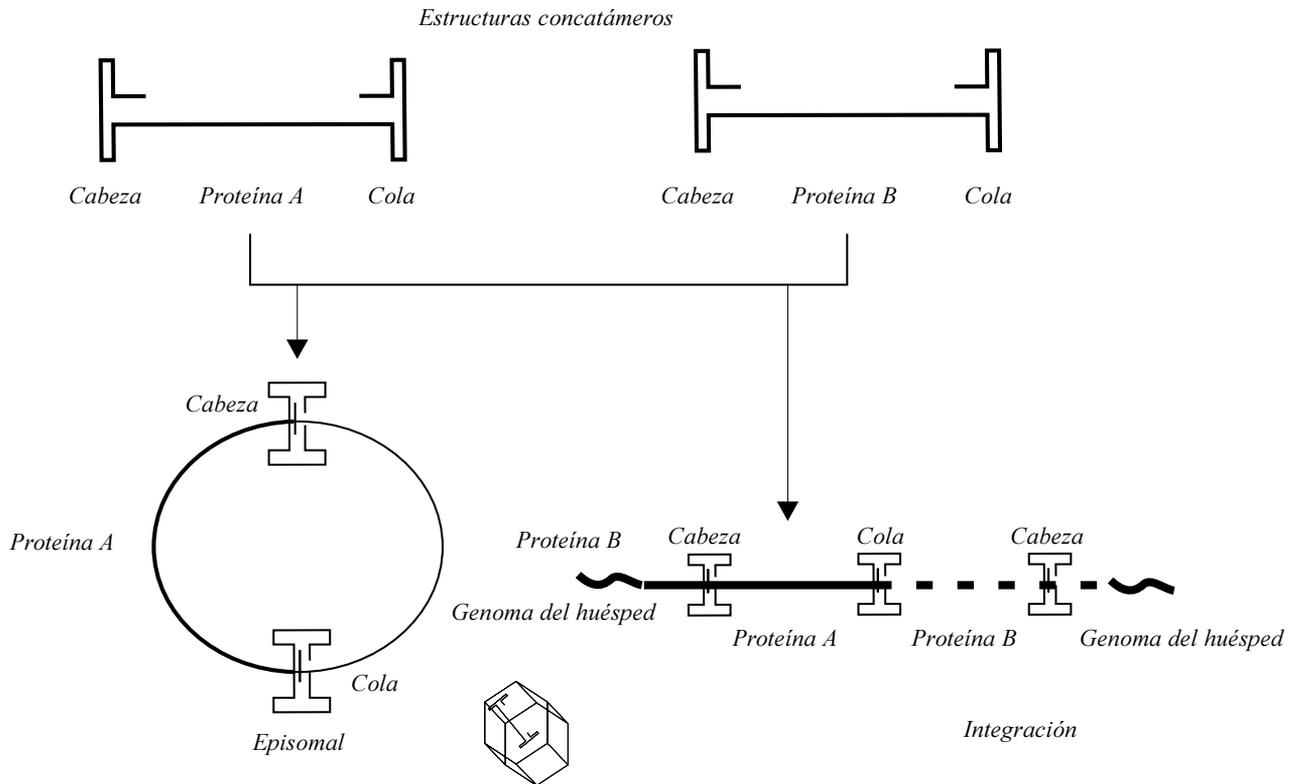


Figura 3. Las estructuras de concatámeros son formadas por la unión cabeza-cola de dos o más genomas de adenoasociados a través de una recombinación de los ITR's. Las estructuras episomales son circulares mientras las estructuras lineales se forman en la integración al genoma huésped.

quedo por las secuencias de los ITR del AAV y las secuencias ITR del Ad. Los Ad producidos son removidos de la preparación por una purificación subsiguiente.

2. Una línea celular que expresa constitutivamente el cassette del transgén-ITR del AAV es infectada con un herpes virus recombinante que provee las funciones de replicación necesarias para el AAV; mientras las secuencias Rep/Cap le son proporcionadas *in trans*. Debido a que el HV recombinante no es competente en replicación, una purificación específica no es indispensable.

Sin embargo, ninguno de estos protocolos ha podido solucionar una de las mayores desventajas que presentan los AAV, que es el hecho de que no se puede producir en grandes títulos como se requiere para su empleo en protocolos clínicos.⁹

PURIFICACIÓN

Para la producción de grandes títulos de partículas virales, además del método de preparación, influye el método de purificación en la cantidad de partículas infeccio-

sas obtenidas. El método de purificación es uno de los pasos cruciales en la cantidad de partículas infecciosas. Existen varios métodos para la purificación de AAV entre los que están los siguientes:

Gradientes diferenciales en cloruro de cesio

Fue el primer método descrito y el más utilizado hasta el momento. Este método presenta desventajas para la purificación de AAV porque disminuye la infectividad de las partículas virales de manera proporcional al número de horas que éstas pasan en el CsCl. Esta metodología involucra hasta 72 horas de exposición de las partículas al CsCl, por lo que el radio de copias de genoma/partículas infecciosas se ve incrementado. Además, las preparaciones resultan con contaminación de proteínas no-virales y se presentan variaciones de estos factores de lote a otro.

Iodixanol/Purificación por columna

Esta metodología combina el uso de la ultracentrifugación utilizando el iodixanol, en lugar del CsCl y una purificación por afinidad en una columna de hepa-

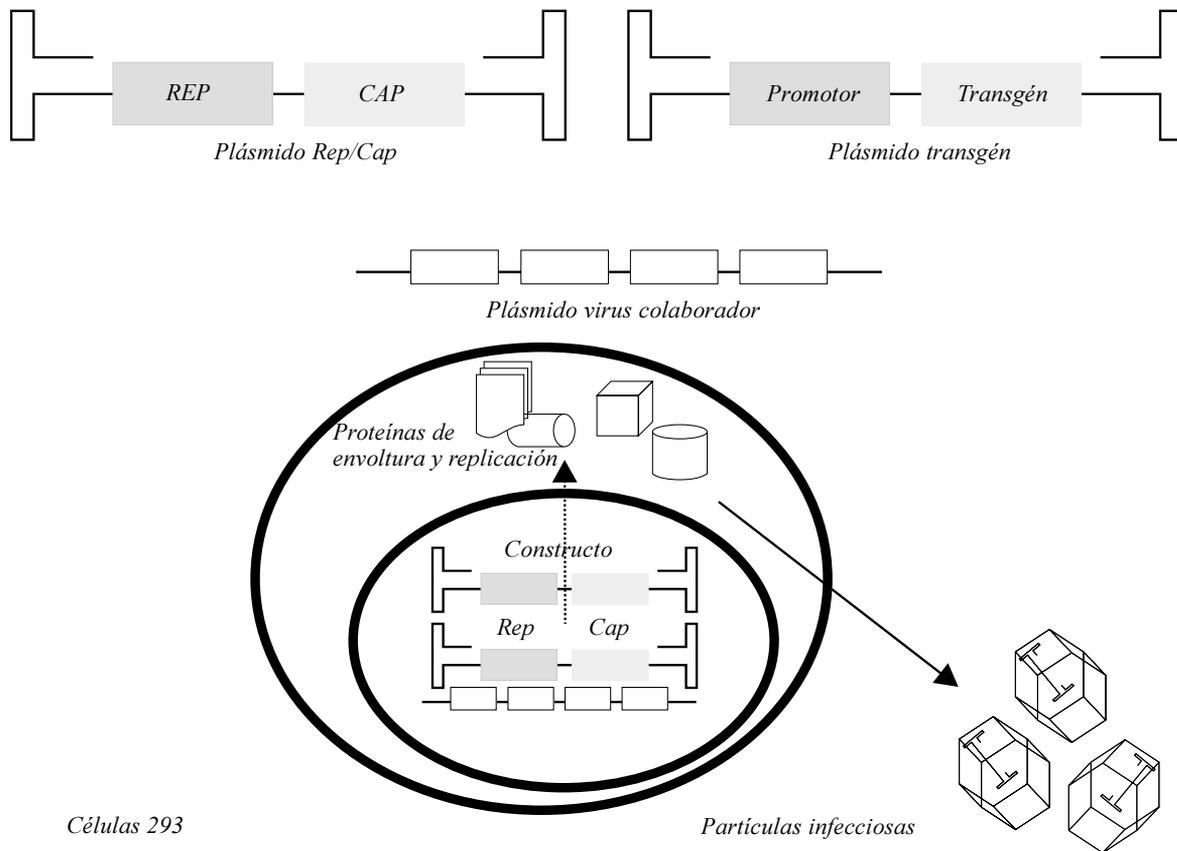


Figura 4. La triple transducción es el método de elección para la producción de adenoasociados. Consiste en la transducción simultánea en células 293 de tres plásmidos: uno con la secuencia de las proteínas Rep y Cap del AAV; otro con la secuencia de las proteínas necesarias para la replicación provenientes del virus colaborador y un tercero con el constructo del transgén deseado.

rina. La pureza y cantidad de las partículas de AAV son similares a las obtenidas por HPLC y purificación por columna.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con el uso de esta tecnología se logra obtener preparaciones con alta pureza proteica y con más partículas infecciosas que con el método convencional de CsCl. A pesar de que este proceso se realiza en menor tiempo, presenta la enorme desventaja de que se requiere de equipo y personal altamente especializado, los cuales no están a disposición de muchos laboratorios.

Purificación por columna

Hasta el momento resulta ser la más rápida y presenta un índice de pureza adecuado, mayor tasa de partículas virales/partículas infecciosas, así como buena reproducibilidad. Basa su fundamento en la afinidad de los AAV a la heparina.³⁹

PROTOCOLOS EXITOSOS QUE UTILIZAN AAV COMO VECTORES

Hasta el momento se han llevado a cabo varios protocolos experimentales que han tenido éxito debido a una expresión sostenida de la proteína transgénica. Entre ellos se pueden mencionar los siguientes padecimientos:

Hemofilia A

Este padecimiento hereditario se debe a la deficiencia del factor VIII de la coagulación, con una vida media de sólo 12 horas, por lo que su administración en episodios hemorrágicos y/o como prevención hace que las infusiones sean imprácticas. Ratones inmunocompetentes fueron transducidos vía vena porta con un vector AAV conteniendo el gen humano modificado del factor VIII (hFVIII). La transducción de los hepatocitos se detectó a las cuatro semanas manteniéndose una expresión constante de la proteína hasta por más de 11 meses. Los nive-

les de expresión fueron 1-2% mayores de los normales en el humano.⁴⁰

Hemofilia B

La enfermedad se caracteriza por la deficiencia del factor IX de la coagulación. Mediante la aplicación de un constructo de adenoasociado conteniendo el factor IX humano (rAAV.EF α 1.hFIX) vía vena porta, se mantuvo la expresión de la proteína en los hepatocitos por 8-10 meses y niveles detectables en plasma de este factor por 35 días, con un incremento del 1-2% del factor IX plasmático.⁴¹ Por otro lado, el resultado más prometedor ha sido obtenido de modelos murinos hemofílicos. La administración de otro constructo el rAAV.LPS.cFIX vía vena porta corrigió el desorden hemorrágico, logrando sostener la expresión del factor IX en niveles funcionales hasta por más de cinco meses, presentando pruebas funcionales como tiempo de protrombina y la prueba del clip mejoradas y cercanas al normal por el mismo periodo de tiempo.⁴²

Enfermedad de Fabry

La enzima lisosomal α -galactosidasa A (α -gal A) es responsable de la hidrólisis del enlace α -galactósido terminal de varios glicolípidos, como la globo triasil-ceramida (Gb3), también conocida como trihexosida ceramida. La deficiencia de la enzima conduce a la acumulación de Gb3 en el endotelio de los vasos sanguíneos de riñón, hígado, corazón, bazo y plasma de los pacientes que la sufren. La transducción de las células hepáticas de ratones Fabry con el rAAV.EF1- α .AGA vía vena porta logró producir la proteína en niveles séricos de hasta 20-35% comparados con los normales, por un periodo de seis meses. Dentro de las dos a cinco semanas postratamiento se lograron reducciones significativas del acúmulo de Gb3 en varios tejidos como hígado, bazo y corazón.⁴³

Ceguera infantil

La ceguera infantil es una enfermedad causada por varias degeneraciones retinales, de las cuales la más severa es la amaurosis congénita de Leber (LCA); que ocasiona ceguera casi total en la infancia teniendo como origen mutaciones en el gen de la proteína *RPE65* involucrada en el metabolismo de retinoides, cuya deficiencia conlleva a la acumulación de ésteres transretinoides, alteración de los fotorreceptores, inclusiones

en el epitelio de la retina y lenta degeneración retinal. Un modelo animal natural de esta patología es el perro *RPE65*^{-/-}, que tiene una delección de 4 pb en el gen, lo que genera un codón de paro prematuro que trunca la proteína. Este modelo presenta alteraciones similares a las apreciadas en los humanos con LCA. La administración subretinal de un AAVr portando el gen *RPE65* silvestre, restauró la visión del canino, monitoreada por la amplitud de las ondas a (fotorreceptores) y ondas b (células bipolares), las cuales alcanzan intensidades similares a las normales. Por pupilometría, la contracción de la pupila se situó en un rango medio entre la respuesta de un animal normal y uno no tratado. Cuatro meses después de la administración la evaluación visual cualitativa fue consistente con los resultados electrofisiológicos, en donde los animales tratados que alcanzaron el grado de "vista normal" evitaron los objetos colocados enfrente y a la derecha de ellos (lado de la administración), pero consistentemente chocaron con los objetos a su izquierda.⁴⁴

TERAPIA GÉNICA PARA ENFERMEDADES HEPÁTICAS. USOS DE VECTORES ADENOVIRALES Y ADENOASOCIADOS

Los diversos protocolos de terapia génica existentes para las enfermedades hepáticas se basan en su mayoría en el uso de adenovirus y adenoasociados como vectores génicos. La principal patología a tratar con estas estrategias es la cirrosis hepática, la cual es el resultado de un padecimiento crónico caracterizado por la formación de una cicatriz fibrótica que reemplaza a la matriz extracelular normal. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y su etiología incluye infecciones virales (HCV, HBV), consumo excesivo de alcohol o de fármacos hepatotóxicos. La estrategia ideal para el tratamiento de la cirrosis debe incluir prevención de fibrogenesis, estimulación de la regeneración hepatocelular y de la reorganización de la arquitectura hepática.

ADENOVIRUS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Los adenovirus son reconocidos por su elevado tropismo hepático cuando son administrados por vía sistémica, numerosos estudios que utilizan genes como MMP1, HGF, nNOS,⁴⁵⁻⁴⁷ incluidos los de nuestro grupo con los genes terapéuticos de uPA humano y MMP-8^{48,49} han demostrado una eficiente transducción en hígados de ratas cirróticas por tetracloruro de carbono de hasta 40% y de 10% en ratas cirróticas por LDB; mientras en ratas

sanas se detectó una transducción de 80-90% al utilizar una dosis de 3×10^{11} pv/rata vía vena iliaca de un Ad5.LacZ,⁵ la población celular que logra ser transducida es hepatocitos, células endoteliales y células estelares hepáticas, habiendo una disminución de aproximadamente 10% en la transducción visualizada en las ratas cirróticas respecto a las sanas.⁴⁷

En ratón se reporta una transducción hepática de 40% en animales sanos, 80% en cirróticos y 40% en un modelo de hepatitis fulminante para una dosis de 4×10^9 pfu/ratón por vena de la cola.⁵⁰

En los diversos modelos experimentales de cirrosis existentes, diversas vías de administración han sido usadas, por ejemplo, vena femoral en ratas cirróticas por administración intragástrica de CCl_4 y por LDB en un título de 1.5×10^{11} pfu/kg que logra una expresión considerable de la enzima nNOS cuya actividad logra reducir la resistencia intrahepática y la presión portal.⁴⁷ En el modelo de ligadura de ducto biliar (LDB); con el gen de SMAD 7 administrado por la vena porta y la de la cola logra bloquear la señalización de TGF- β ;⁵¹ mientras un mRNA antisentido para TGF- β 1 administrado en dosis de 1×10^{10} pfu/kg se expresa 800 veces más que su contraparte endógena, los dos tratamientos suficientes para reducir la expresión de colágena y de α -SMA, marcadores de la actividad de las células estelares principales responsables de la fibrogénesis hepática.⁵² Por otro lado, estudios con interferón- α (IFN- α) de rata como gen terapéutico acarreado en un vector adenoviral y administrado intravenosamente en ratas cirróticas según el modelo de dimetilnitrosamida, logran a través de la expresión del IFN- α prevenir la evolución de la cirrosis hepática en este modelo.⁵³

Otras vías de administración han sido evaluadas para una expresión hepática, por ejemplo la administración de la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) cuya deficiencia ocasiona una acumulación letal de γ -hidroxibutirato (GHB); administrada en adenovirus de primera generación por vía intraperitoneal y retroorbital logra expresarse a nivel hepático con una actividad de 20% y una disminución hasta de 80% del acúmulo GHB en hígado, riñón, suero y cerebro.⁵⁴

En nuestro grupo de trabajo las estrategias terapéuticas para la cirrosis hepática con los genes de MMP-8⁴⁹ y h Δ UPA⁴⁸ en vectores adenovirales han resultado exitosas y se perfilan como opción viable y efectiva para el tratamiento de esta patología y otras con mecanismos fisiopatológicos similares de los procesos

fibróticos. En el caso de hígado, la principal desventaja de los adenovectores consiste en la elevada respuesta inmune y la corta longitud de la expresión génica lograda con nuestros constructos. Parámetros tales como contenido de colágena, analizado por la cuantificación de HyP, expresión de genes de colágena, MMP's y sus inhibidores (TIMP's) presentaron mejoras notables con los tratamientos de uPA y MMP-8. El análisis morfométrico asistido por computadora revela una reducción de 80% de la cicatriz fibrótica en los modelos de cirrosis por intoxicación crónica de CCl_4 , tratados con h Δ uPA. Posteriormente, nuestro grupo demostró que el efecto coadyuvante de terapia génica más cirugía resultó en mejoría notable para aliviar la cirrosis producida por obstrucción de las vías biliares, entidad nosológica semejante a la cirrosis biliar secundaria en el humano. Así, el tratamiento con h Δ uPA logró reversión de la fibrosis de 25.8% en el modelo de cirrosis por obstrucción, y 42-56% más anastomosis biliodigestiva y mejorías notables en la circulación colateral.⁵⁵ En el caso del gen de la colagenasa de neutrófilos (MMP-8) las reducciones logradas fueron de 30-60% para el modelo de CCl_4 y de 45% para LDB junto con anastomosis. Buscando siempre la mejora continua, innovamos hacia la introducción de estos cassettes de expresión en vectores adenoasociados, con lo que pretendemos incrementar la persistencia de la expresión con nula respuesta inmune, dejando abierta la posibilidad de readministraciones, lo que posiblemente genere efectos aún más notables en la reversión de los indicadores de fibrosis y en los signos y síntomas de la cirrosis hepática.

ADENOASOCIADOS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Los adenoasociados son preferentemente administrados intramuscularmente, por lo que su eficiencia para enfermedades hepáticas por esta vía es realmente limitada y provoca que el transgene sólo tenga un efecto local que no logra verse reflejado en hígado.⁵⁶ El hecho de que los AAVr no tengan un tropismo particular cuando son administrados intravenosamente ha propiciado que las administraciones intravenosas se realicen en arteria hepática y vena porta mostrando niveles de expresión similares por cualquiera de estas dos rutas.⁵⁷

El futuro de los adenoasociados se perfila prometedor, los estudios actuales encaminados a lograr su total entendimiento vislumbran que pueden llegar a ser los vectores virales más socorridos para su uso en proto-

colos clínicos debido a las facilidades y ventajas que presentan. Los adenoasociados vienen a resolver muchos de los problemas que atañen a la aplicación de la terapia génica en humanos, como son la generación de una baja respuesta inmune, nula patogenicidad y la posibilidad de una administración única que logre el efecto deseado. Hace 10 años la terapia génica se veía como ficción. Ahora, representa una opción real que puede revolucionar el tratamiento de diversas enfermedades cronicodegenerativas.

REFERENCIAS

- Vassilopoulos G, Stamatoyannopoulos G. The basics of gene therapy vectors. *Haema* 2000; 3: 214-28.
- Hillemann MR, Werner JR. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 85: 183-8.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Adenoviridae. In: Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego Academic Press; 2000, p. 227-38.
- Russell WC. Update in adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000; 81: 2573-604.
- García-Bañuelos J, Siller-López F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Córdova E, Armendáriz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002; 9: 127-34.
- Smith CA, Woodruff LS, Rooney C, Kitchingman GR. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum Gen Ther* 1998; 9(10): 1419-27.
- Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, Chamberlain JS. Production and characterization of improved adenovirus vectors with E1, E2b, and E3 gene deleted. *J Virol* 1998; 72: 926-33.
- Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 1990; 54: 316-29.
- Monahan PE, Samulski J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 2000; (6): 433-40.
- Weitzman M, Kyostio S, Kotin R, Owens R. Adeno-associated virus (AAV) rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *PNAS* 1994; 91: 5808.
- Berns KI, Giraud C. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 218: 1-23.
- Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; 63: 3822-8.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76(2): 791-801.
- Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* 2000; 74: 3852-8.
- Handa A, Muramatsu S, Qiu J, Mizukami H, Brown Kevin E. Adeno-associated virus (AAV3) based vectors transduce hematopoietic cells not susceptible of transduction with AAV2 based vectors. *J Gen Virol* 2000; 81: 2077-84.
- Xiao W, Chirmule N, Berta S, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus vectors type 1. *J Virol* 1999; 73: 3994-4003.
- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991; 10: 3941-50.
- Satoh W, Hiral Y, Tamayose K, Shimada T. Site-specific integration of an adeno-associated virus vector plasmid mediated by regulated expression of Rep based on Cre-lox P recombination. *J Virol* 2000; 74: 10631-8.
- Miao C, Snyder R, Schowalter D, Patijn G, Winther B, Kay M. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nature Genetics* 1998; 19: 13-15.
- Xiao W, Berta SC, Lu M, Moscioni D, Tazelaar J, Wilson J. Adeno-associated virus as a vector for liver directed gene therapy. *J Virol* 1998; 72: 10222-6.
- Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell M, Hughes J, Zoltick P, Wilson J. Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* 2000; 74: 2420-5.
- Rusell DW, Miller AD, Alexander IE. Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *PNAS* 1994; 91: 8915-19.
- Miao CH, Nakai H, Thompson R, Storm TA, Chiu W, Snyder R, Kay M. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol* 2000; 74(8): 3793-803.
- Summerford C, Samulski RD. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998; 72: 1438-45.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. α V- β 5 integrin: A co-receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Nature Medicine* 1999; 5: 78-82.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Medicine* 1999; 5: 71-7.
- Ferrari F, Samulski T, Schenk T, Samulski RJ. Second strand synthesis is a rate limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996; 70(5): 3227-34.
- Keyun Q, Xu-Shan W, Dagmar MK, Selvarangan P, Anil B, Arun S. Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *PNAS* 1997; 94: 10879-89.
- Trahair TN, Alexander IE, Rowe PB, Smythe JA. The adenovirus E4 ORF6 and E1b 55kDa proteins cooperate in a p53-independent manner to enhance transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gen Virol* 2000; 81: 2983-91.
- Alexander IE, Rusell DW, Miller AD. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1994; 68: 8282-7.
- Fisher K, Gao GP, Weitzman MD, DeMateo R, Burda J, Wilson JM. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 1996; 70: 520-32.
- Wheeler M, Kono H, Rusyn I, Arteil GE, McCarty D, Samulski RJ, Thurman RG. Chronic ethanol increases adeno-associated viral transgene expression in rat liver via oxidant and NF κ B-dependent mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1000-59.
- Yalkinoglu A, Heilbronn R, Bürkle A, Schlehofer J, Hausen H. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* 1988; 48: 3123-9.
- Lipkowitz M, Hanss B, Tulchin N, Wilson N, Langer J, Ross M, Kurtman G, Klotman P, Klotman M. Transduction of renal cells in vitro and in vivo by adeno-associated virus gene therapy vectors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1908-15.
- Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudas L, Zhang Y, Fisher K, Engelhardt J. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 1998; 72: 8568-77.
- Nakai H, Ytant Stephen R, Storm Theresa A, Fuess S, Meuse L, Kay M. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 2001; 75(15): 6969-76.
- Yang J, Zhou W, Zhang Y, Zidon T, Ritchie T, Engelhardt JF. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* 1999; 73: 9468-77.
- Nakai H, Storm T, Kay M. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* 2000; 74(20): 9451-63.

39. Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, Guang-Ping G, Wilson JM. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gen Ther* 2001; 12: 71-6.
40. Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood* 2000; 95: 1594-9.
41. Nakai H, Herzog R, Hagstrom N, Walter J, Kung S, Yang E, Tai S, Iwaki Y, Kurtzman G, Fisher K, Colosi P, Couto L, High K. Adeno-associated viral vector mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood* 1998; 91: 4600-7.
42. Wang L, Tabake K, Bidlingmaier S, III C, Verma I. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *PNAS* 1999; 96: 3906-10.
43. Jung SC, Han IP, Limaye A, Xu R, Gelderman MP, Zerfas P, Tirumalai K, Murray GJ, During MJ, Brady RO, Qasba P. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice. *PNAS* 2001; 98: 2676-81.
44. Acland G, Aguirre G, Ray J, Zhang Q, Aleman T, Cideciyan A, Pearce-Kelling S, Anand V, Zeng Y, Maguire A, Jacobson S, Hauswirth W, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature Genetics* 2001; 28: 92-5.
45. Limuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner D, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 2003; 124: 445-58.
46. Ueki T, Kaneda K, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Med* 1999; 5: 226-30.
47. Qing Yu, Rong S, Qian H, George SE, Rockey D. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat ameliorates portal hypertension. *JCI* 2000; 105: 741-8.
48. Salgado S, García J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernández-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendáriz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Molecular Therapy* 2000; 2: 545-51.
49. Siller-López F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, García J, Vera J, Gálvez J, Hernández I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendáriz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1122-33.
50. Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Yoshiji H, Nagao S, Fukui H. Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000; 47: 563-70.
51. Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad 7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-91.
52. Arias M, Lehnen-Sauer S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner A, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a TGF- β 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterology* 2003; 3: 29.
53. Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, Yoshida T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther* 2003; 10: 765-73.
54. Gupta M, Janses EE, Senephansiri H, Jakobs C, Snead OC, Grompe M, Gibbons KM. Liver-directed adenoviral gene transfer in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Ther* 2004; 9: 527-39.
55. Miranda-Díaz A, Rincón A, Salgado S, Vera-Cruz J, Gálvez J, Islas MC, Berumen J, Aguilar-Cordova E, Armendáriz-Borunda J. Improved effects of viral gene delivery of human uPA plus biliodigestive anastomosis induce recovery from experimental biliary cirrhosis. *Molecular Therapy* 2004; 9: 30-7.
56. Zaratiegui M, Castilla-Cortazar I, García M, Quiroga J, Prieto J, Novo FJ. IGF-1 gene transfer into skeletal muscle using recombinant adeno-associated virus in a rat model of liver cirrhosis. *J Physiol Biochem* 2002; 58(3): 169-76.
57. High KA, Herzog R, Arruda V. AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood*; 101: 333-3339.