

REVISTA MEDICA

DEL

HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR. CARLOS SAENZ HERRERA

San José Costa Rica, A.C.

Volúmenes 26 - 28
1993

Número Especial
Dedicado al XXX Aniversario del Hospital

SUMARIO

12561

	Págs.
Editorial	
TERAPIA GENICA HUMANA	
Carlos De Céspedes	1
UNIDAD DE TRANSPLANTE	
Eduardo Mora	23
TRANSPLANTE DE RIÑON	
Gilbert Madrigal	41
TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA	
Oscar Porras	55
AVANCES EN LA ANTIBIOTICO TERAPIA PEDIATRICA	
Adriano Arguedas	77
ENFERMEDADES AUTOINMUNES REUMATICAS EN PEDIATRIA	
Oscar Porras, Manuel Adames, Olga Arguedas e Iris Leiva	93
EPILEPSIA EN LA NIÑEZ	
Fernando Sell	117
VOMITOS Y REGURGITACION EN EL LACTANTE	
Celina Guzmán	133
AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES SOLIDOS DEL NIÑO EN COSTA RICA	
Jose F. Lobo e Ivette Garcia	153
INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN NIÑOS	
Oscar Porras	163
SINUSITIS EN LOS NIÑOS	
José F. Chavarría	177
CRISIS FAMILIARES ANTE LAS ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN NIÑOS	
Silvia Urrutia e Iris M. Obando	189
RIESGOS CON HEMOTERAPIA	
Cecilia Lizano	199

Dra. Cecilia Lizano
Directora

Dr. Carlos Sáenz Herrera
Director Fundador

Dr. Edgar Mohs
Director del Hospital

COMITE DE REDACCION

Dr. Carlos Arrea
Dr. Alba R. Loría

Dr. Jaime Guevara

Dr. Yadira Estrada
Dr. Marco L. Herrera



REGULACIONES

1. *La "Revista Médica del Hospital Nacional de Niños" sólo publicará trabajos inéditos. Si éstos han sido presentados en alguna reunión científica, se debe hacer constar así.*
2. *Todo trabajo se presentará escrito a máquina por un solo lado de la hoja, a doble espacio, en papel blanco tamaño carta.*
3. *Los cuadros y tablas deben presentarse hechos a máquina; los gráficos dibujados con tinta china y las fotografías en papel satinado positivo. Todos deberán llevar el número y el título o leyenda respectivos.*
4. *Todo artículo deberá acompañarse del resumen en español. Se publicarán resúmenes en otro idioma, cuando el autor lo solicite.*
5. *La bibliografía se debe presentar ordenada alfabéticamente y de acuerdo con las respectivas reglas internacionales.*
6. *La Dirección de la Revista y el Comité de Redacción, se reservan el derecho de aceptar o de rechazar los artículos sometidos a su consideración.*
7. *No se enviarán al autor pruebas para su corrección, ni se le devolverán originales, los cuales quedarán en el archivo de la Revista.*
8. *El autor o los autores tendrán derecho a veinticinco separatas; cualquier cantidad adicional por encima de esa cifra, correrá por cuenta del interesado.*

INFORMACION

Los trabajos deberán entregarse personalmente en la Dirección de la Revista o enviarse por correo al apartado 1654-1000, San José, Costa Rica, C.A.

La correspondencia dirigida a la Revista debe enviarse al mismo apartado.

EDITORIAL

El Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, en mayo de 1994 cumplirá 30 años de servir al país, a través de un gran esfuerzo por dar a los niños enfermos la mejor solución a sus problemas de salud. Durante todo este largo tiempo, hemos puesto al servicio de la niñez los progresos de la medicina, hemos contribuido a lograr índices de mortalidad infantil que están entre los más bajos de Latinoamérica y continuamos el esfuerzo para crecer de acuerdo con las necesidades, cada vez más numerosas y complejas, de atención al niño enfermo.

Cuando apenas iniciábamos actividades dentro de este Hospital, se hizo sentir el consenso de crear un medio informativo para dar a conocer nuestro progreso a través de artículos que llevaran recomendaciones útiles a los pediatras, y otros profesionales o personas interesadas en el quehacer científico relacionado con la salud del niño. En 1966 comenzamos la tarea de impulsar la comunicación de lo más relevante de nuestra experiencia, y de esa devoción hemos recogido fruto que se manifiesta con la acogida a nuestras publicaciones tanto en el ámbito nacional como externo.

La evolución del Hospital y su influencia en la vida del país acentúan cada vez más la necesidad de contar con este órgano de difusión de conocimiento que ha de subsistir como parte importante de la vida misma del Hospital y del futuro Centro de Ciencias Médicas.

Continuaremos trabajando por un presente exitoso y un futuro aun mejor.

Esta publicación une los artículos de tres volúmenes fundamentalmente de revisión actualizada, y está dedicada en forma especial a la celebración del XXX Aniversario del Hospital, en mayo de 1994.

Dra. Cecilia Lizano
Directora
Revista Médica del Hospital Nacional
de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera



Terapia génica humana

Dr. Carlos de Céspedes*

Como señala W. Franchi Anderson, pionero prominente de la terapia génica, esta modalidad de tratamiento ha progresado de la especulación a la realidad en poco tiempo.

El principio básico de la terapia génica es la introducción de un gen recombinante normal en las células de un individuo para reconstruir los productos específicos de ese gen, prácticamente en todos los casos proteínas o polipéptidos, y restablecer sus funciones.

Los genes pueden introducirse en células germinales (óvulo y espermatozoide) o en células somáticas. En el primer caso, el gen normal se introduce en la célula germinal afectada o alternativamente en una célula del embrión en etapas tempranas, siendo en ambos casos transmitido en forma mendeliana a la progenie. En el segundo caso, el gen se introduce en células somáticas, limitándose la terapia génica al paciente, sin que se transmita el cambio genético a la progenie.

Por razones de seguridad, la terapia génica en humanos se limita por el momento al segundo caso, o sea a la Terapia Génica en Células Somáticas (TGCS).

La TGCS, debido a limitaciones técnicas, no involucra por el momento la remoción o reparación del gen que contiene la mutación patológica, lo que sería ideal. Si se logra que el gen se exprese, el principio básico de la terapia génica señalado arriba se cumple, aunque el gen terapéutico quede localizado fuera de su locus natural y aun sin integrarse en algún cromosoma. En los trastornos dominantes, sin embargo, la presencia del alelo normal puede contrarrestar el efecto correctivo del gen recombinante normal introducido. En estos casos sería deseable reemplazar o reparar el alelo afectado.

Las enfermedades genéticas por defectos en un solo gen o mendelianas, representan el modelo lógico para la aplicación de la TGCS en humanos, aunque potencialmente es posible su aplicación a enfermedades poligénicas/multifactoriales y aun adquiridas, lo que representaría un mayor impacto en la Medicina.

* Director, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica. Jefe de Servicio de Genética y Metabolismo, Hospital Nal. Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, San José - Costa Rica.

Los aspectos éticos de la terapia génica en humanos, no sólo contemplan la exclusión de experimentos en células germinales, sino también la limitación del procedimiento a la cura de enfermedades graves para las cuales no existe tratamiento aceptable, excluyéndose de esta manera los factores eugénicos (cosméticos) como sería el caso de mejorar atributos de un individuo "normal" como estatura, inteligencia, etc. De hecho existen temores de que la terapia génica pudiera servir de instrumento para exacerbar el racismo y para iniciativas de programas eugénicos dirigidos a fortalecer o alterar capacidades humanas, no siempre con intenciones loables sino más bien protervas en algunas situaciones.

En la presente revisión, analizaremos los métodos para la transferencia de genes en células y animales vivos, aplicaciones de la terapia génica en Medicina, ejemplos de enfermedades genéticas y no genéticas que están siendo tratadas experimentalmente con TGCS en humanos y los aspectos éticos y legales relacionados.

Métodos para la transferencia somática de genes.

En el Cuadro 1 se resumen los requerimientos para que un sistema de transferencia de genes sea potencialmente beneficioso en el tratamiento de enfermedades humanas. Cada trastorno patológico puede diferir en cuanto a la demanda en mayor o menor grado de cada uno de estos requerimientos. En la Figura 1 se muestran los tejidos y órganos susceptibles de terapia génica en humanos.

Cuadro 1

Sistema de transferencia de genes, Requerimientos

-
1. Alta eficiencia de transmisión
 2. Mantener estable el DNA foráneo (integrado en el genoma del receptor o como elemento extracromosómico)
 3. Expresión en el tejido relevante.
 4. Expresión apropiada y regulada en el tejido blanco.
 5. Seguridad adecuada en el momento de la transferencia y durante la vida del receptor.
-

Blancos para Terapia Génica Somática

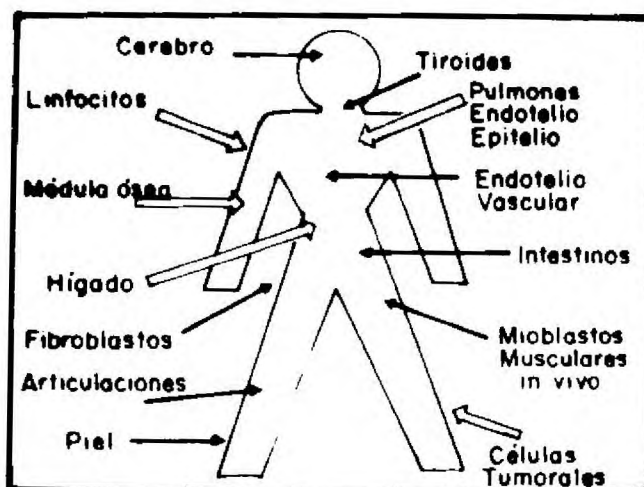


Figura 1: Blancos potenciales de la terapia génica somática. Los blancos indicados con flechas claras son objeto de investigación clínica en la actualidad.

En algunas enfermedades, la localización del gen en el tejido en que se expresa el gen natural es indispensable, por ejemplo el sistema nervioso central en las formas neuronopáticas de las enfermedades lisosomales de depósito. Asimismo, la corrección de defecto a nivel del gen en las hemoglobinopatías y en la Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID), tienen un requerimiento estricto por la serie eritroide y por la médula ósea respectivamente. La enzima deficiente en la fenilcetonuria se localiza normalmente en el hígado. Como la función a restablecer en esta enfermedad es la conversión de fenilalanina a tirosina, es concebible que esta función pueda realizarse en otro tejido más accesible como la médula ósea para la introducción y la expresión del gen de la fenilalanina hidroxilasa. El requerimiento de cofactores, se podría llenar convenientemente administrando oralmente la tetrahidropterina necesaria en este caso.

Enfermedades provocadas por deficiencias de proteínas circulantes en la sangre como los factores VIII y IX en la hemofilia A y B respectivamente, podrían corregirse introduciendo el gen correspondiente en cualquier célula que sea capaz de expresarlo y de secretar el producto a la circulación. De hecho, experimentos en ratones demuestran que es posible la expresión del gen y la secreción del factor IX a la circulación con fibroblastos de piel como célula receptora.

La transferencia de genes recombinantes a células somáticas se realiza en la actualidad por dos grandes métodos: la transferencia de genes mediada por el DNA

consiste en introducir en las células, DNA solo o en forma de complejos de DNA unidos a diversos acarreadores en las células y se denomina transfección. La transferencia de genes mediada por virus, consiste en el uso de partículas virales como vehículos para traspasar genes a células por el proceso de infección, lo que se conoce generalmente como transducción.

TRANSFECCION. Transferencia de genes mediada por DNA.

Células en cultivo captan el DNA bajo ciertas circunstancias, con la consiguiente expresión de sus productos.

La microinyección es un método directo, que consiste en la inyección física del DNA con una pipeta de vidrio muy fina, en el núcleo de células en cultivo. Otro método extremadamente simple en principio, consiste en la precipitación del DNA con fosfato de calcio y ponerlo en contacto con la superficie de las células. La electroporación consiste en exponer las células a un shock eléctrico, lo que abre poros en la membrana celular. Los liposomas, con su capacidad para fusionarse con la membrana celular pueden introducir DNA contenido en el interior acuoso de estas esferas lipídicas. También se ha utilizado el bombardeo de la célula con partículas magnéticas unidas al DNA.

La integración del DNA en los cromosomas por estos métodos químicos y físicos es, sin embargo, rara. Sólo una de cada 1.000 a 100.000 células integra el gen de interés en su genoma. Aunque, como se señalaba al principio, la integración no es en todos los casos esencial para la expresión de un gen, la misma es generalmente de duración limitada cuando se realiza fuera de los cromosomas. A este fenómeno se le ha llamado período de expresión transitoria.

TRANSDUCCION. Transferencia de genes mediada por virus.

Los virus pueden integrar moléculas recombinantes de DNA lo cual, junto con su capacidad de infectar células, hace que algunos de ellos sean vectores eficientes para introducir genes a las mismas. Como se señalaba anteriormente, a diferencia de los métodos químicos y físicos, algunos virus tienen la capacidad de introducir en forma estable el gen recombinante en el genoma del receptor.

Un elemento fundamental en la transferencia de genes mediada por virus, es la presencia de la transcriptasa reversa en los retrovirus. Esta enzima convierte el RNA viral de cadena simple que constituye el genoma del virus, en una copia de DNA de cadena doble capaz de integrarse por recombinación (utilizando una integrasa

también codificada por el virus) como un provirus, en el genoma de la célula huésped. Este provirus es capaz de utilizar la maquinaria de la célula para transcribir y traducir el genoma viral y producir copias del genoma de RNA así como de las proteínas virales. En el ciclo de reproducción de un retrovirus infectante, la partícula viral completa puede ensamblarse en el citoplasma y estas partículas infecciosas virales pueden atravesar la membrana celular de la célula huésped por exocitosis e infectar otras células.

En la Figura 2 A se muestra la estructura del genoma de un retrovirus. En cada extremo se encuentra una secuencia llamada repetitiva larga terminal (LTR, long terminal repeat). Esta secuencia contiene al promotor y los elementos necesarios para la traducción de los tres genes principales del virus, *gag*, *pol* y *env*, que codifican para el núcleo viral, la transcriptasa reversa y las glicoproteínas de la envoltura, respectivamente. Además existe una secuencia cerca del extremo 5' - LTR conocida como sitio ψ (psi), que es esencial para empacar el transcrito RNA viral.

La ingeniería genética permite modificar a los retrovirus de manera que puedan expresar un gen foráneo, perdiendo la capacidad de producir partículas virales infectantes. Para esto, los genes *gag*, *pol* y *env* son sustituidos por un cDNA humano que codifica para la proteína terapéutica (Figura 2 B). La secuencia puede aprovecharse convenientemente para empacar este gen foráneo dentro de una partícula retroviral defectuosa, o sea que no puede dar lugar al virus infectante original. Se requiere de una segunda estructura retroviral para la producción de este retrovirus defectuoso, lo cual se logra eliminando la secuencia ψ (Figura 2 C). Esta estructura ψ - contiene el resto del genoma del retrovirus, incluyendo los genes *gag*, *pol* y *env*. Las células transfectadas con esta estructura ψ -, se denominan células empacantes (o células "colaboradoras"), ya que producen las proteínas necesarias para el ensamblaje de una proteína viral infecciosa (Figura 3).

En vista de que el genoma (RNA) viral no contiene la secuencia (Figuras 2 C y 3 B), no puede ser empacado. Si las células colaboradoras son transfectadas con una estructura recombinante ψ + (Figura 3 A), que contiene la secuencia cDNA foránea, se ensambla en la célula colaboradora (Figura 3 C) una partícula viral que contiene únicamente el RNA recombinante (Figura 3 D). Este virus recombinante, puede utilizarse entonces para transducir células somáticas en forma eficiente e introducir un gen foráneo que va a expresar la proteína terapéutica, sin la producción subsecuente de partículas virales infecciosas (Figura 3 E).

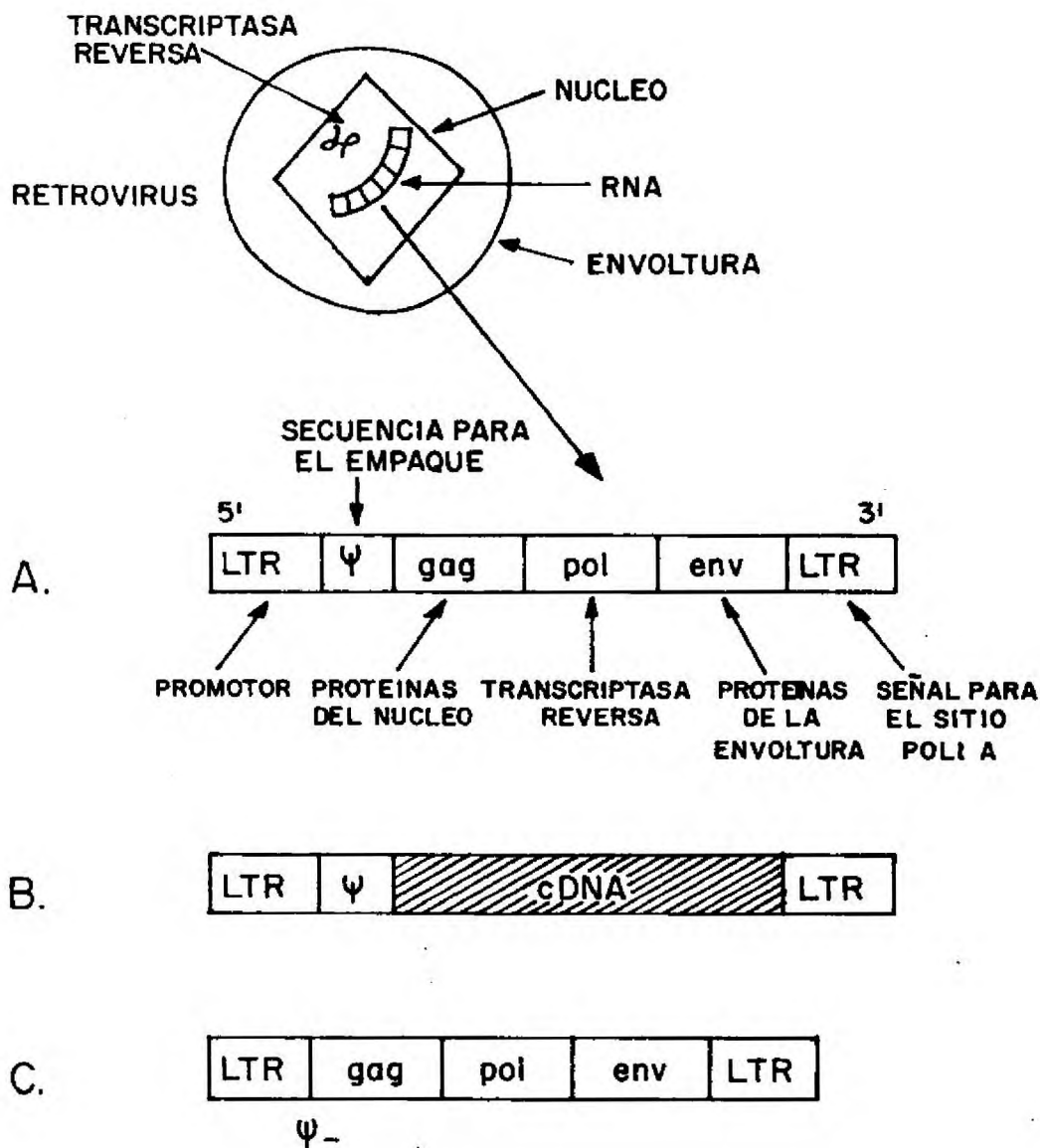


Figura 2: Modificación del genoma de un retrovirus para experimentos de transferencia de genes. A. Genoma de un retrovirus. B. Retrovirus reconstituido con un cDNA humano que reemplaza a los genes *gag*, *pol* y *env*. C. Genoma del retrovirus con una deleción de la secuencia que se requiere normalmente para empacarlo.

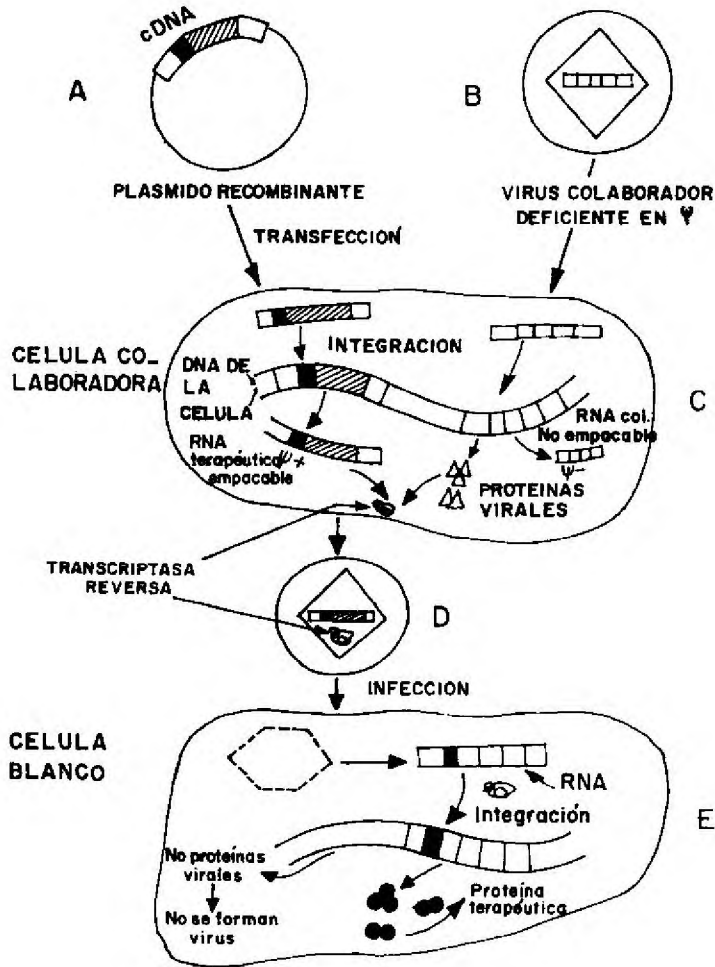


Figura 3: Transferencia somática de un gen mediada por retrovirus. Un vector con el cDNA recombinante humano terapéutico se inserta como un provirus en el genoma de la célula colaboradora, con las secuencias retrovirales flanqueantes LTR. El virus colaborador, deficiente en Ψ (psi), produce todas las proteínas virales, pero no puede empaquetar su propio RNA. Como el vector recombinante contiene a la secuencia Ψ , el RNA transcrito del gen terapéutico integrado (3 C) es encapsulado automáticamente por las proteínas virales producidas por el DNA provirus en las células colaboradoras empaquetantes (3 C). Las partículas virales resultantes (3 D) son liberadas por exocitosis de la membrana plasmática de la célula colaboradora (3 D). Estos virus "domados" no pueden reproducirse, ya que carecen de la información para formar las proteínas virales. Células blanco (ej. células de la médula ósea humana) son entonces infectadas con estos virus (3 E). Como estas partículas tienen transcriptasa reversa, integran el genoma RNA terapéutico del virus como un provirus en el genoma de la célula blanco. Este provirus se expresa con la formación de la proteína terapéutica.

Riesgos potenciales de la terapia génica

Como la integración de los genes se hace generalmente al azar en el genoma, existe el riesgo potencial de perturbar otros genes que podrían ser críticos para la función normal o la supervivencia de la población entera de células huésped con consecuencias deletéreas para el organismo. Uno de los peligros potenciales más serios de la integración al azar de genes foráneos es la posibilidad de inactivar un gen supresor de tumores o de activar un oncogene.

Los virus adeno-asociados (AAV) representan una excepción en lo que respecta a integración del gen recombinante al azar en el genoma del receptor, ya que frecuentemente dicha integración ocurre en una región pequeña del cromosoma 19 humano. Sin embargo, como esta región ha sido implicada en rearrreglos cromosómicos asociados con leucemias crónicas de células B no es claro, desde el punto de vista de bioseguridad, que dicha integración específica de sitio represente alguna ventaja sobre la integración al azar en este caso.

La experiencia después de los 106 años-mono y 23 años-paciente en individuos que han experimentado transferencia de genes mediada por retrovirus ha mostrado, sin embargo, ausencia de efectos colaterales y nunca se ha observado una transformación maligna como resultado de la transferencia defectuosa de un vector retroviral. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que dichos eventos indeseables son poco probables, debido al enorme tamaño del genoma humano, aunque siempre será deseable tener al menos una idea del lugar en que el gen recombinante termina localizándose.

Por otro lado, se ha observado el desarrollo de linfomas malignos de células T en 3 monos, probablemente el resultado de una preparación contaminada con el virus colaborador. Este hallazgo confirma la necesidad de usar preparaciones con vectores libres de virus colaboradores, según lineamientos expresos de las instancias reguladoras (*vide infra*) de los experimentos en terapia génica humana.

De hecho, la experimentación previa en animales debe ser un pre-requisito para intentar el experimento equivalente de terapia génica en humanos. Estos experimentos en animales pueden dar una idea más aproximada acerca de los posibles efectos deletéreos señalados, de que el gen insertado va a funcionar adecuadamente y por tiempo prolongado, aunque la extrapolación de la situación en animales a la del humano no siempre es posible en su totalidad. Una limitación de estos ensayos en animales es la escasez de modelos naturales de la enfermedad particular. Esto se ha logrado solventar mediante la "fabricación" de cepas de animales, transgénicos que manifiestan la enfermedad, obtenidas al introducir el gen humano responsable de la enfermedad en estudio, en óvulos fertilizados.

Terapia génica *ex vivo* e *in vivo*.

Cada trastorno, en gran parte debido a su localización tisular, presenta problemas no sólo de biología molecular sino de procedimientos clínicos y quirúrgicos. Desde el punto de vista de hacer llegar el gen recombinante a las células blanco en el paciente, existen en la actualidad dos procedimientos. La terapia génica *ex vivo*, consiste en extraer parte del tejido al cual se pretende introducir el gen, reconstituir las células con el gen normal *in vitro* y transplantar en forma autóloga las células expresando ese gen normal (Figura 4). La terapia génica *in vivo*, consiste en la introducción de un gen por transfección o por transducción en el organismo intacto (ej. vía intravenosa, aerosol, etc.) sin utilizar procedimientos altamente invasivos. Esta modalidad es desde luego la más conveniente y no se distingue en principio de la administración convencional de medicamentos en medicina.

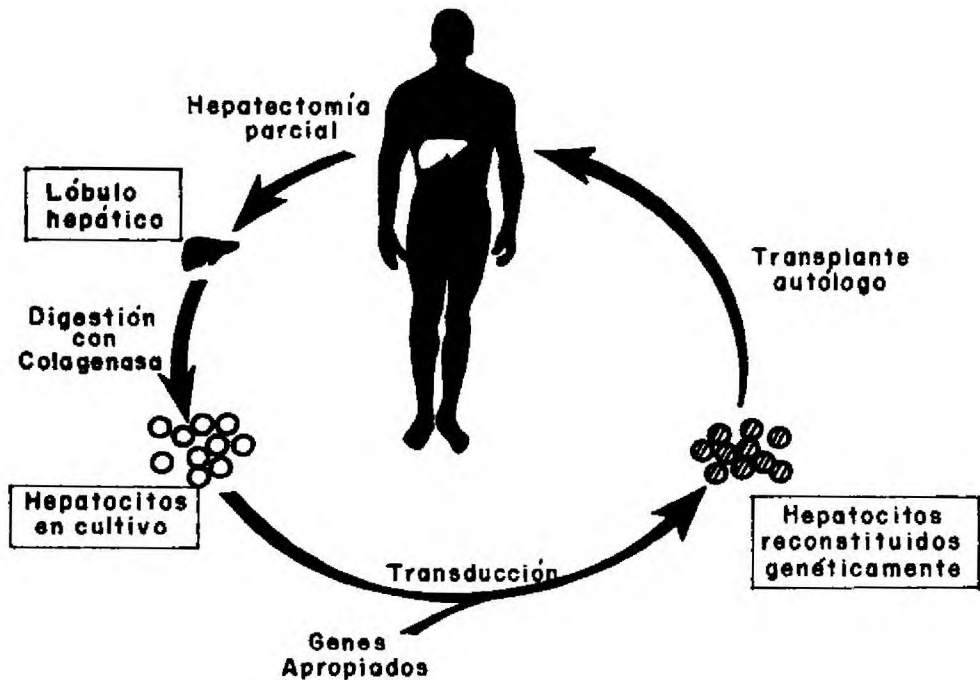


Figura 4: Estrategia *ex vivo* para la terapia génica hepática. El enfoque de la terapia génica hepática *ex vivo*, esquematizado sistemáticamente.

Los experimentos *ex vivo* son costosos, ineficientes y estarían prácticamente limitados a países desarrollados. En el caso de tejidos que no sean sangre o médula ósea, implican cirugía, en ocasiones, muy agresiva. Debe enfatizarse que un aspecto crítico de la terapia génica es la duración de la expresión del gen, que puede determinar la necesidad de repetir el procedimiento periódicamente. De acuerdo con esto es explicable que gran parte de los esfuerzos de investigación para aplicar la terapia génica en humanos estén dirigidos al desarrollo de procedimientos *in vivo*.

Transferencia de genes *in vivo* utilizando vectores virales.

Los retrovirus han mostrado ser más adecuados para terapia génica *ex vivo*, pero pueden no ser tan adecuados para terapia génica *in vivo*. Un problema grande es que los vectores retrovirales actualmente en uso, son inactivados por complemento humano.

La proclividad del adenovirus por el tracto respiratorio, los hace vectores muy adecuados para enfermedades originadas por defectos en células de esa localización como la fibrosis quística.

Los virus herpes que tienen capacidad de persistir en estado latente en el SNC, podrían ser vehículos apropiados para lograr expresión prolongada de genes recombinantes, lo cual hasta el momento no se ha logrado.

Transferencia de genes *in vivo* utilizando vectores de DNA.

La transferencia a hepatocitos se ha logrado por medio de complejos DNA-asialoglicoproteína que son captados por el receptor de asialoglicoproteína en la membrana celular del hepatocito. La expresión aquí también, sin embargo, se limita a varios días.

Es de suponer que la transferencia de genes mediada por DNA es más segura que métodos que requieren vectores virales, aunque no existe prueba de ello. De acuerdo con algunos reportes, la administración de DNA a animales no resulta en la formación de anticuerpos contra el DNA. Por otro lado, aunque la integración es más probable con vectores virales, no se sabe si podría haber integración estable en algún cromosoma con efectos adversos. Además, se debe evaluar cuidadosamente la posibilidad de que vehículos como las asialoglicoproteínas, utilizados para tratar de optimizar la transferencia de genes, puedan provocar respuestas inmunológicas u otras reacciones adversas. La necesidad de un control de calidad para estas sustancias igual o más riguroso que el que se realiza con los medicamentos o vacunas convencionales debe ser enfatizada.

Como se señaló al principio, la expresión transitoria limitada generalmente a unos días, es una desventaja clara de la transferencia de genes que utiliza DNA solo o conjugado.

El lugar de la terapia génica en medicina.

La investigación en terapia génica se ha enfocado a enfermedades hereditarias provocadas por un solo gen defectuoso, como la fibrosis quística, hemofilia y la talasemia, entre otras.

Cada vez se reconoce más, sin embargo, que la transferencia de genes va a ser aplicable ampliamente a varias enfermedades comunes de origen multifactorial. El advenimiento de la tecnología de recombinación del DNA y el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano, ha hecho posible describir muchas enfermedades comunes en términos de la interacción entre factores genéticos discretos y factores ambientales que ejercen presión sobre la capacidad de aquéllos para mantener un estado de homeostasis y salud. Como consecuencia de esto, muchas enfermedades que no se consideran clásicamente como genéticas pueden hacerse susceptibles de tratamiento, utilizando genes como medicamentos. Por ejemplo, enfermedades como la psoriasis que involucran la expresión inapropiada de citoquinas o factores inflamatorios, podría tratarse inhibiendo la expresión de estos factores o su interacción con los tejidos afectados. Enfermedades degenerativas como el Parkinson o la osteoporosis, podrían ser tratadas por la expresión de factores esenciales para la función continuada o la regeneración de los tejidos afectados. Trastornos como la hipercolesterolemia de origen multifactorial, podrían ser tratados reforzando la capacidad del organismo para metabolizar lípidos patogénicos a productos inocuos.

Para algunas enfermedades del sistema nervioso central se está ensayando con cierto éxito en animales una combinación de transferencia de genes *in vitro* junto con injerto autólogo de células en regiones específicas del cerebro.

Ejemplos de trastornos actualmente en experimentación en humanos.

En el Cuadro 2 se enumeran las principales enfermedades monogénicas consideradas para terapia génica en humanos.

Cuadro 2

**Enfermedades por defectos de un solo gen:
blancos actuales de la terapia génica***

Enfermedad	Gen defectuoso
INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA (SCID)	Adenosina desaminasa
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	Receptor de la LDL
Hemofilia	Factor IX
	Factor VIII
Enf. de Gaucher	Glucocerebrosidasa
Mucopolisacaridosis	β -glucuronidasa
Enfisema	α_1 - antitripsina
FIBROSIS QUISTICA	Regulador transmembrana (CFTR)
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Hiperamonemia	Ornitina transcarbamilasa
Citruinemia	Arginino succinato sintetasa
Distrofia muscular	Distrofina
Talasemia	β - globina
Drepanocitosis	β - globina
Def. adhesión leucocitaria	CD - 18

En mayúsculas aquellos casos en que se han iniciado protocolos en humanos.

Inmunodeficiencia combinada severa (SCID) por deficiencia de adenosina desaminasa.

La terapia génica *ex vivo* es, desde luego, más fácil en células circulantes de la sangre como linfocitos, que pueden ser fácilmente extraídos y regresados al torrente sanguíneo o a la médula ósea, después de introducirles el gen recombinante normal *in vitro*. La experiencia con los procedimientos inherentes de cosechar, cultivar y transplantar las células en los trasplantes de médula ósea convencionales, ha sido un factor determinante para que la mayoría de los investigadores en terapia génica se hayan concentrado hasta el momento en este tejido. Una limitación de este método es, aun cuando se logre una expresión duradera, la corta vida media de estas células

lo que obliga a repetirlo periódicamente. El ideal, todavía difícil de alcanzar, es lograr introducir el gen en una población determinada de células pluripotenciales. Con esto, presumiblemente se lograría repletar toda la masa de elementos derivados de la médula ósea, incluyendo su migración fuera de ella, estableciendo líneas celulares diferenciadas en otras regiones del organismo como las células de Kupffer en el hígado, todas expresando el gen recombinante que se introdujo inicialmente.

De hecho, las enfermedades candidato para este tipo de terapia génica son aquellas que han sido tratadas exitosamente con trasplante de médula ósea autólogo, como la SCID, causada por una deficiencia de la enzima del metabolismo de las purinas adenosina desaminasa (ADA). Esta deficiencia resulta en una acumulación de 2 - desoxiadenosina en los linfocitos T, afectando seriamente su función inmunológica. Aunque el trasplante de médula ósea convencional ha sido correctivo en ésta y otras enfermedades, la terapia génica obvia la necesidad de conseguir un donador compatible, lo cual se logra sólo en aproximadamente una tercera parte de los pacientes.

El primer protocolo clínico para terapia génica de una enfermedad fue aprobado en setiembre de 1990, precisamente para introducir el gen de la ADA humana en los linfocitos de una niña afectada con SCID.

La SCID ha sido posible corregirla en forma parcial, con inyecciones semanales de ADA humana conjugada con polietilén-glicol (PEG-ADA), lográndose disminuir la 2-desoxiadenosina circulante con recuperación clínica. La experiencia con este primer protocolo de terapia génica, sin embargo, ha mostrado que al lograrse una disminución de este nucleósido dentro de las propias células T, se logra una mejor corrección del fenotipo clínico.

En esta niña, la expresión del gen se ha demostrado por un período de meses, con corrección de la función inmunológica, medida por tests estándar de laboratorio y con una mejoría clínica notable.

Se ha sugerido que otras enfermedades metabólicas en las cuales las células derivadas de la médula ósea no son el sitio primario de la patología, podrían ser tratadas en forma efectiva, transfiriendo el gen apropiado a células pluripotenciales, sobre todo en el caso de que la enzima o proteína producto del gen pueda ser secretada eficientemente por la célula transducida o transfectada y captada por las células primariamente afectadas en otros tejidos.

Hipercolesterolemia familiar

El hígado capta el colesterol plasmático transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), por medio de receptores específicos (receptores - LDL) en la membrana celular del hepatocito. La hipercolesterolemia familiar (HF), es un trastorno mendeliano con un patrón de herencia autosómico dominante, causado por una mutación específica en el gen que determina la síntesis de los receptores - LDL. En la forma homocigota de la HF prácticamente no existen receptores, observándose elevaciones exageradas en la concentración del colesterol plasmático que pueden llevar a infarto del miocardio en los primeros años de la vida. El único tratamiento efectivo, al menos teóricamente, es la introducción de un gen normal del receptor - LDL en el hepatocito.

Existe un valioso modelo animal de la HF, el conejo de Watanabe, en el cual se ha logrado la expresión del gen de los receptores - LDL hasta por 6 meses, lográndose una disminución del 30% en el colesterol sanguíneo. Esto motivó la aceptación de un protocolo en humanos homocigotos para la HF, el primero de los cuales se inició en junio de 1991.

La condición para incluir a un paciente en los protocolos de terapia génica de la HF, es que haya sufrido daño cardíaco severo. Los resultados preliminares en cuanto a la disminución del colesterol plasmático en los pacientes que han sido sometidos a terapia génica, son similares a los observados en el conejo (Dra. Mariann Grossman, comunicación personal).

Terapia génica de la fibrosis quística

La base genética de la fibrosis quística es una de diferentes mutaciones, todas en el mismo locus en el cromosoma 7, en el gen que determina la síntesis de la proteína denominada CFTR, (cystic fibrosis transmembrana conductance regulator), el regulador de la conductancia transmembrana. La disfunción de esta proteína lleva a alteraciones en el flujo de cloruro y de sodio, lo que ocasiona trastornos en el transporte de agua a través del epitelio bronquial e intestinal, provocando espesamiento del moco (mucoviscidosis) que a su vez determina la patología pulmonar y pancreática.

La particular accesibilidad del tracto respiratorio, plantea la atractiva posibilidad de utilizar sistemas de transferencia del DNA por aerosol.

Los adenovirus son particularmente atractivos como vectores, por ser patógenos naturales de las vías aéreas y porque su biología molecular se conoce bastante bien,

lo que permite insertar con relativa facilidad genes humanos normales en su genoma. Con este sistema se ha logrado en forma muy eficiente, la transferencia de un gen humano de CFTR en las vías aéreas de ratas Cotton. La proporción de epitelio bronquial que expresaba el gen era significativa, detectándose RNA de CFTR hasta por 6 semanas. La proteína se detectó en las células por lavado bronquial. Los efectos fisiológicos de este tratamiento no han sido determinados.

Por otro lado la introducción, por medio de un liposoma, de un plásmido con una copia del gen normal de la CFTR en las vías respiratorias de ratones transgénicos con fibrosis quística, ha resultado en la expresión de una proteína funcional en la tráquea. Ensayos de terapia génica para la fibrosis quística en humanos han sido iniciados en 1992, sin que se conozcan resultados al momento de escribir esta revisión.

En la terapia génica de la fibrosis quística, surgen una serie de preguntas importantes que es pertinente analizar, sobre todo porque ilustran problemas comunes a otras enfermedades en la aplicación de la terapia génica en humanos.

1. ¿Cuáles son las células más relevantes para ser tratadas?

La expresión del CFTR en las células que cubren la vía aérea es muy baja, siendo más alta en las glándulas submucosas. Esto sugiere que el mucus anormal tiene su origen en estas glándulas, que son potencialmente menos asequibles a un vector administrado por aerosol. El defecto fundamental del canal de cloruro en la fibrosis quística es demostrable en esas células superficiales por lo que supuestamente la corrección del defecto en las mismas podría ser beneficioso.

2. ¿Qué fracción de las células responsables debe ser corregida para lograr beneficio clínico?

Es muy poco probable en éste como en cualquier otro caso de terapia génica, que la transferencia del gen alcance el 100% de las células. Estudios experimentales *in vitro* muestran que la función fisiológica del CFTR puede restablecerse normalmente en un cultivo en que sólo fue posible modificar genéticamente el 6% de las células. Este hallazgo es muy promisorio, aunque debe demostrarse su reproducción *in vivo*.

3. ¿Es tóxica la sobreexpresión del CFTR?

Es también promisorio el hecho de que un exceso de CFTR logrado experimentalmente en ratones transgénicos, no produjo manifestaciones de toxicidad.

4. ¿Por cuánto tiempo persistirá la expresión?

Esta pregunta central de la terapia génica la hemos comentado en otras partes del texto y sigue siendo, como en prácticamente todos los casos, uno de los problemas más importantes a resolver en el caso específico de la fibrosis quística. Como se ha mencionado, los retrovirus al integrar eficientemente el gen terapéutico en el genoma, tienen una mayor probabilidad de persistencia a largo plazo, aunque con el peligro de activar oncogenes por integración al azar. Es de recordar que los retrovirus requieren que las células se encuentren en proceso de división para ser transducidas; paradójicamente, la fuerte reacción inflamatoria en los pulmones de la fibrosis quística podría aumentar la proporción de células en proceso de división.

Los adenovirus, que no integran, podrían alcanzar potencialmente una expresión eficiente en células que no se encuentran en división (aproximadamente el 98% de la vía aérea normal), pero no se esperaría que esa expresión persista en forma permanente.

5. ¿Podría intervenir el sistema inmune?

Debe considerarse seriamente la posibilidad de una respuesta inmune al vector o al CFTR expresado. El hecho de que la mayoría de los pacientes tienen al menos niveles detectables de CFTR, hace menos probable esta reacción indeseable del organismo. Sólo en aquellos pacientes en que no se expresa prácticamente nada de la proteína (mutación "knock out" de ambos alelos), en que el CFTR terapéutico es totalmente extraño al organismo, podría esperarse una reacción inmune. Entre los vectores utilizados, los adenovirus son especialmente reconocidos como inductores de reacciones inmunes. Esto limitaría la dosificación repetida que es probablemente necesaria con vectores no integradores.

6. ¿Puede garantizarse la seguridad?

La posibilidad, aunque por el momento teórica, de la transferencia inadvertida de genes a la línea germinal (transmisión heredada o vertical) o de transmisión (horizontal) de virus recombinantes a otros individuos por contaminación del ambiente con vectores en aerosol, debe siempre considerarse.

Terapia génica del cáncer

El melanoma ha sido el primer tumor maligno que se ha intentado tratar con terapia génica.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un poderoso agente anticancerígeno en ratones. En humanos, sin embargo, dosis más de 50 veces menores que la tolerada por los ratones, son tóxicas. Por otro lado, existen linfocitos infiltradores de tumores (TIL) que pueden transducirse con el gen del TNF, de forma que podrían liberar este factor dentro del tumor. De hecho, en un protocolo iniciado en enero de 1991, TIL transducidos con el gen del TNF, han sido administrados a pacientes con melanoma maligno sin que se hayan presentado efectos colaterales indeseables, aunque aun no se sabe si existe efecto terapéutico sobre el cáncer.

La inmunoterapia es uno de los enfoques que ha motivado gran actividad en el tratamiento experimental del cáncer, ahora reforzado por la terapia génica.

Experimentos en animales han mostrado que células tumorales transducidas con el gen de la citoquina interleukina (IL-2), producen inmunidad antitumoral sistémica mediada por las células T. En humanos se han iniciado protocolos en que estas células tumorales autólogas secretoras de citoquinas se inyectan subcutánea o intradérmicamente, en la parte superior del muslo. Veintiún días después se remueve el sitio de la inyección y los nódulos linfáticos que drenan esa zona, se cultivan y se crecen en condiciones que estimulan el crecimiento de las células T. Estas células se administran al paciente junto con IL-2. Al momento de escribir esta revisión, no se conocen resultados de estos estudios de "vacunas antitumorales".

Otro enfoque consiste en introducir en células tumorales genes para la timidina quinasa del virus herpes simplex, haciéndolas susceptibles de ser destruidas por el agente antiviral ganciclovir. Aquí tampoco se conoce de resultados en humanos.

Terapia génica del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Un lugar para la terapia génica en el tratamiento del sida y otras enfermedades infecciosas, está en crear un ambiente desfavorable a la replicación viral a través de introducir genes apropiados en el huésped. El virus VIH penetra a las células T, después de que una proteína en su cubierta, se fija a una molécula llamada CD4. Si se logra a través de terapia génica la producción de un exceso de moléculas CD4 que

se harían presentes en la sangre, éstas fijarían al virus VIH, previniendo su entrada a la célula. Otro enfoque busca una sobreproducción de la región TAR del genoma del VIH, lo que resulta supuestamente en la unión competitiva de la proteína viral transactivadora "tat", interfiriéndose de esta manera con la replicación del virus. No se conocen resultados terapéuticos en humanos de este sugestivo enfoque.

Problemas en la aplicación clínica de la TGCS.

La aplicación de métodos a la TGCS debe adaptarse a estándares y rutinas de la práctica clínica.

La primera preocupación es la seguridad. En cada paciente, como en cualquier otra terapia médica, debe balancearse el riesgo con el beneficio. La evaluación del riesgo debe hacerse no sólo en cuanto a la transferencia del gen mismo, sino en cuanto a riesgos accesorios asociados con procedimientos quirúrgicos que se requieran (hepatectomías sustanciales, por ejemplo).

Los medicamentos génicos estarán sujetos a los mismos tests de toxicidad, control de calidad y potencia requeridos para productos farmacéuticos convencionales derivados de componentes químicos o biológicos. En forma similar, los vectores virales serán juzgados por estándares establecidos para vacunas virales atenuadas.

Existe ventaja en ensayos clínicos que incorporen metodologías clínicas en uso actual, como es el caso citado de la médula ósea, que se benefician no sólo de la competencia técnica existente, sino también de estándares establecidos de control de calidad y de seguridad.

Los primeros ensayos clínicos de terapia génica han atraído y posiblemente seguirán atrayendo en forma creciente una gran cantidad de interés público. La educación a la comunidad es, por lo tanto, un componente de la TGCS que no se debe despreciar.

Estos ensayos requieren de un equipo interdisciplinario de biólogos moleculares, médicos clínicos, cirujanos, enfermeras y administradores y la contribución de cada uno es esencial para el éxito de la etapa experimental y su posterior uso rutinario.

Aspectos éticos y legales.

Los experimentos en terapia génica, presentan muchas consideraciones de tipo ético y de bioseguridad comunes a otros procedimientos altamente experimentales en terapéutica médica y otros que son específicos, como la transmisión vertical u horizontal de genes recombinantes mencionados anteriormente.

Al igual que con otras enfermedades para las cuales no existe tratamiento como muchos tipos de cáncer, sida, etc., en los experimentos de terapia génica se debe considerar un beneficio incierto versus un riesgo potencial para el individuo, el consentimiento informado adecuado en menores y en pacientes incapacitados mentalmente, la decisión entre terapias convencionales y el tratamiento experimental.

No obstante, se debe recordar que agentes quimioterapéuticos para el cáncer en uso actual, también poseen la capacidad potencial de mutar o alterar el DNA de células en el receptor y están asociados con toxicidad sustancial.

En los Estados Unidos, cada propuesta de investigación de terapia génica en humanos debe ser aprobada por los Institutos de Salud (National Institutes of Health, NIH) y la Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration, FDA), previa revisión por el Comité de Investigación (Institutional Review Board, IRB) y el Comité Institucional de Bioseguridad (Institutional Biosafety Committee, IBC), estos dos últimos al nivel local de cada institución. El NIH tiene internamente un subcomité de Terapia Génica Humana y el Comité Asesor en DNA recombinante (Recombinant Advisory Committee, RAC). El proceso de aprobación incluye comentarios de la comunidad y una vez que el estudio se inicia, se deben presentar informes periódicos al NIH cada seis meses y cada año a la FDA. Cualquier efecto adverso serio, debe comunicarse inmediatamente a estas mismas instancias.

Conclusión

Aparte de una vigilancia constante a las transgresiones éticas que pudieran darse conforme avance la aplicación de la terapia génica en humanos, la aplicación de esta modalidad terapéutica de punta todavía debe esperar la resolución de problemas técnicos clave, especialmente en lo que se refiere a la transferencia de genes y al trasplante de células.

Es pertinente destacar la advertencia de Richard Mulligan, acerca del aparente descuido de estándares normales de rigor científico ante el fervor de introducir la terapia génica en la clínica. Insiste en que los criterios de interpretación científica no deben confundirse con criterios de interpretación clínica y que los logros sean evaluados por investigadores independientes de reconocida solvencia científica y moral, no por los medios de comunicación masiva.

Literatura de apoyo

1. Anderson WF.: Human Gene Therapy. *Science* 256: 809, 1992.
2. Collins FS.: Cystic Fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774, 1992.
3. Desnick RJ. & Schuchman EM.: Human gene therapy: strategies and prospects for inborn errors of metabolism. En: Desnick RJ (ed) *Treatment of genetic diseases*, First ed. Churchill Livingstone, New York, pp 259, 1991.
4. Kay MA., Ponder KP. & Woo SLC.: Human gene therapy: present and future. *Breast Cancer Research and Treatment* 21: 83, 1992.
5. Ledley FD.: Are contemporary methods for somatic gene therapy suitable for clinical applications? *Clin. Invest. Med.* 16: 78, 1993.
6. Ledley FD.: Somatic gene therapy for human disease: Background and prospects. Part I *J. Pediatr.* 110: 1, 1987.
7. Ledley FD.: Somatic gene therapy for human disease: Background and prospects. Part II *J. Pediatr.* 110: 167, 1987.
8. Ledley FD.: Current status of somatic gene therapy. *Growth Genet. & Horm.* 8: 1, 1992.
9. Miller AD.: Human Gene Therapy comes of age. *Nature* 357: 455, 1992.
10. Mulligan RC.: The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926, 1993.

11. Shapiro LJ.: Gene Therapy: Possibilities and Promise. *Pediatr. Res.* 33: 321, 1993.
12. Verma IM.: Gene Therapy. *Scient. Amer. Nov.*: 34, 1990.
13. Weatherall DA.: Gene Therapy. En: Watherali JD (ed) *The New Genetics and Clinical Practice*, 3th ed. Oxford Medical Publications, Oxford pp. 309, 1991.

Glosario

Alelo: una forma alternativa de un gen en un locus determinado.

cDNA: DNA complementario sintetizado del RNA maduro que corresponde a las secuencias codificantes, del DNA genómico que se expresan como proteínas.

Células somáticas: todas las células del organismo excepto los gametos y sus precursores.

DNA genómico: DNA del genoma que contiene todas las secuencias codificantes (exones) y no codificantes (intrones y otras) en contraste con el cDNA que contiene sólo las secuencias codificantes.

Dominante (trastorno, rasgo, menos correctamente gen): aquellos trastornos que se expresan en heterocigotos (individuos con una copia del gen mutante y una copia del alelo normal).

Gen: la unidad fundamental de la herencia. Definido funcionalmente por su producto, prácticamente siempre una proteína. Definido estructuralmente como una secuencia ordenada de nucleótidos localizada en una posición particular en un determinado cromosoma, que incluye no sólo las regiones que codifican para una proteína específica funcional, sino también las regiones involucradas en la regulación de la expresión.

Genoma: la información genética completa de un organismo, generalmente descrita como el número total de pares de bases; el genoma humano tiene 3×10^9 pares de bases.

Homocigoto: un individuo que tiene un par de alelos idénticos en un locus determinado de un par de cromosomas homólogos.

Heterocigoto: un individuo que tiene dos alelos diferentes en un locus determinado de un par de cromosomas homólogos.

Locus: una posición o localización específica de un gen en el genoma.

Moléculas (o genes) DNA recombinantes: Moléculas de DNA o genes completos que son combinados y comprobados en el laboratorio.

Proyecto del Genoma Humano: el plan para mapear y secuenciar el genoma humano en su totalidad a completarse por el año 2005.

Recesivo (trastorno, rasgo, menos correctamente gen): aquellos trastornos que sólo se manifiestan clínicamente en individuos homocigotos para el gen mutante (ambos alelos están afectados).

Retrovirus: virus cuyo genoma está constituido por RNA que codifica para la enzima transcriptasa reversa de forma que su genoma puede ser transcrito en el DNA genoma de la célula huésped.

Secuencia: orden de bases en el DNA o en el RNA, o de aminoácidos en una proteína.

Transcriptasa reversa: una enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de un RNA molde.