

# ESTADO ACTUAL, CONSIDERACIONES ÉTICAS Y PERSPECTIVAS DE LA TERAPIA GÉNICA EN ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

por

Carlos Javier Alméciga-Díaz<sup>1</sup>, Homero Sáenz<sup>2</sup> & Luis Alejandro Barrera A.<sup>1‡</sup>

## Resumen

**Alméciga, C.J., H. Sáenz & L. A. Barrera:** Estado actual, consideraciones éticas y perspectivas de la terapia génica en errores innatos del metabolismo. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **30** (117): 525-540, 2006. ISSN 0370-3908.

La terapia génica consiste en la inserción de ADN en células humanas con fines terapéuticos. Aunque inicialmente se propuso para el tratamiento de trastornos monogénicos, su uso se extendió hacia el cáncer y enfermedades infecciosas como el SIDA. Más de 1000 ensayos clínicos han sido realizados desde 1990 y cerca de 5000 pacientes en el mundo portan en sus células ADN exógeno. La eficacia y los riesgos de la terapia génica dependen de los vehículos usados para la transferencia del material genético. En este artículo se discute el estado actual del conocimiento, perspectivas y consideraciones éticas para la implementación de esta alternativa terapéutica en el tratamiento de errores innatos del metabolismo.

**Palabras clave:** Terapia génica, enfermedades genéticas, vectores virales, errores innatos del metabolismo, consideraciones éticas.

## Abstract

In gene therapy DNA is inserted in human cells for therapeutical purposes. Although it was first contemplated as the treatment for monogenic diseases, there are other fields for its applications such as cancer and HIV. Over 1000 clinical trials have been carried out since 1990 and more than 5000 patients in the world carry exogenous DNA in their cells. The efficiency and risks of gene therapy depend on the vehicle used for genetic material transfer. This review discusses the state of the art of gene therapy, the perspectives and ethical issues for the implementation of this therapeutical alternative for inborn errors of metabolism.

**Key words:** Gene therapy, genetic diseases, viral vectors, inborn error metabolism, ethical issues.

<sup>1</sup> Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7A No. 43-82 Edificio 53 laboratorio 305A, Bogotá-Colombia.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación en Biología Celular y Microscopía, Decanato de Medicina, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto - Venezuela.

‡ Correo electrónico: abarrera@javeriana.edu.co.

## Introducción

Las alteraciones bioquímicas que causan la acumulación de sustratos o la deficiencia en la producción de algunos metabolitos, fueron llamados por Garrod Errores Innatos del Metabolismo (EIM), de los cuales se han descrito cerca de 600 (Neufeld EF *et al.*, 2001). La gran mayoría de estas enfermedades se producen por mutaciones que alteran la expresión fenotípica de proteínas. Debido a que estas entidades se generan por alteraciones a nivel genético, no se dispone de tratamientos que permitan la cura de la enfermedad, por lo que su manejo tradicionalmente está dirigido a corregir o prevenir algunas manifestaciones clínicas, mediante el empleo de dietas como en el caso de las acidemias orgánicas y los desórdenes de aminoácidos (Diferrante NM *et al.*, 1971, Braun SE *et al.*, 1993), o el transplante de córnea, el uso de audífonos y la terapia ortopédica en las mucopolisacaridosis (McKinnis EJ *et al.*, 1996, Harris JD *et al.*, 1996). En estas enfermedades, hasta ahora incurables, el tratamiento ideal debe ser aquel que pueda implementarse en etapas muy tempranas de la vida para prevenir la aparición de la sintomatología y las secuelas a largo plazo. A partir de los años 80, la síntesis de oligonucleótidos, el aislamiento y empleo de enzimas de restricción y la utilización de plásmidos bacterianos, reorientaron la investigación en biomedicina y proporcionaron la base experimental para iniciar el desarrollo de terapéuticas no convencionales, como son reemplazar o suplementar los genes defectuosos por medio de la terapia génica (TG) o proveer la enzima deficiente mediante la terapia de reemplazo enzimático (TRE).

En la actualidad, más de 5.000 pacientes llevan en sus cuerpos células modificadas mediante ingeniería genética, producto de 1067 protocolos de terapia génica (Journal of Gene Medicine Clinical Trials Website, 2006). Sin embargo, aunque esta novedosa terapéutica se presentó como la solución esperada por largo tiempo para el tratamiento de un gran número de enfermedades intratables, los resultados en algunos de los pacientes, sugieren que aún no se han logrado los niveles óptimos de seguridad, transferencia y expresión de los genes exógenos. Esto ha conducido a que su empleo se haya restringido, mientras se desarrollan sistemas más eficientes de transferencia de los genes terapéuticos y se profundice en el conocimiento de los mecanismos de expresión y regulación genética (Smith AE *et al.*, 1995; Templeton NS & Lasic D, 2000).

En el presente artículo se discute el estado actual de la terapia génica en los errores innatos del metabolismo, sus perspectivas y las consideraciones éticas sobre el empleo de protocolos de esta alternativa terapéutica.

## Generalidades de la terapia génica

La TG puede ser definida como la transferencia de material genético a las células adecuadas, con el propósito de producir un efecto terapéutico en virtud del cual se logre corregir un defecto genético o permitir la adquisición de una nueva respuesta funcional, como el control de una infección o la inactivación de genes que son indeseables para el organismo. La transferencia génica puede efectuarse *in-situ* o *ex-vivo* (figura 1) y hacerse en células somáticas o germinales.

Aunque los primeros planteamientos sobre TG se remontan a mediados de los 60, fue sólo hasta 1990 cuando se realizó el primer protocolo de TG aprobado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NHI), en el que una paciente con inmunodeficiencia combinada severa recibió linfocitos T transfectados con un retrovirus portando el gen de la adenosina deaminasa (Hilman BC & Sorensen RU, 1994). Desde entonces, la aplicación de la TG ha venido en aumento a pesar de la muerte de un paciente y la aparición de una condición similar a leucemia en otros dos. Aunque inicialmente fue concebida para el manejo de enfermedades monogénicas, con el transcurrir del tiempo se ha enfocado fundamentalmente a la implementación de terapias para cáncer y algunas enfermedades virales (McNeish IA *et al.*, 2004).

Hoy día constituye una importante alternativa para el manejo clínico de enfermedades hasta ahora incurables, entre ellas los errores innatos del metabolismo. En la actualidad se adelantan protocolos, que se encuentran en diferentes etapas preclínicas y clínicas, para patologías como la inmunodeficiencia combinada severa (Cavazzana-Calvo M *et al.*, 2000; Gaspar HB *et al.*, 2002), hemofilias A y B (Walsh CE., 2003), fibrosis quística (Griesenbach U *et al.*, 2002), enfermedad de Parkinson (Burton EA *et al.*, 2003), algunas entidades lisosomales como la enfermedad de Gaucher y varias mucopolisacaridosis, así como algunas aminoacidopatías como la fenilcetonuria, tirosinemia tipo I, homocistinuria y deficiencia de ornitina transcarbamilasa (Cheng SH & Smith AE, 2003; Cabrera-Salazar MA & Barranger JA, 2003). Igualmente se han logrado importantes avances en el manejo de desórdenes psiquiátricos y del sistema nervioso central (Sapolsky R, 2003a; Sapolsky R, 2003b). Sin embargo, problemas como la baja y transitoria expresión del gen de interés, unido a la aparición de reacciones adversas o fuertes respuestas inmunitarias tras la administración del material genético, han impedido alcanzar, por ahora, el éxito propuesto por algunos investigadores.

La manera más directa de administrar el material genético es por inyección de ADN desnudo, método poco eficiente debido a la presencia de enzimas que lo degradan (**Herweijer H & Wolf JA**, 2003). Durante los últimos 20 años se han desarrollado vectores virales y no virales, con el objetivo de optimizar la transferencia génica y lograr una alta expresión del gen de interés durante un periodo prolongado de tiempo, con una mínima generación de efectos adversos. Un método muy corriente es el uso de vectores derivados de virus, entre los que se incluyen retrovirus, virus del herpes simplex, adenovirus, lentivirus y virus adenoasociados (**Smith AE et al.**, 1995; **Kay MA et al.**, 1997; **Templeton NS & Lasic D**, 2000; **García F y Barrera LA**, 2001). Entre los vectores no virales se encuentran los polímeros catiónicos, células encapsuladas en polímeros (**Templeton NS & Lasic D**, 2000), liposomas (**Felgner JH et al.**, 1994), oligonucleótidos antisentido (**Wagner E et al.**, 1991, **Wheeler CJ et al.**, **Collins J et al.**, 1992) y los complejos de material genético con péptidos o polímeros (**Niidade T et al.**, 2002). Paralelamente, se han desarrollado métodos físicos que facilitan y aumentan el ingreso del vector a la célula, como la electroporación, el ultrasonido, la biobalística y la oclusión sanguínea (**Niidade T et al.**, 2002).

### Vectores derivados de retrovirus

Los vectores derivados de retrovirus son virus ARN no patogénicos de cadena sencilla, con un genoma aproximado de 10 kb en el cual se puede insertar material genético de un tamaño entre 6 y 8 kb, después de la remoción de todos los genes virales (figura 2) (**Templeton NS & Lasic D**, 2000). El genoma de estos virus es convertido a una doble cadena de ADN mediante una transcriptasa reversa, luego del ingreso del virus a la célula, para final-

mente ser insertado en el genoma del hospedero por medio de una integrasa (**Templeton NS & Lasic D**, 2000). Este hecho hizo que estos vectores ganaran gran interés, pues permiten una expresión a largo plazo y elevadas concentraciones del producto del gen de interés. Sin embargo pueden traer grandes inconvenientes debido a que esta inserción se realiza al azar, convirtiéndose en potenciales mutágenos por interrupción o activación de genes (**Themis M et al.**, 2003).

A pesar de los elevados niveles de expresión logrados por el uso de estos vectores, su principal deficiencia radica en su capacidad de transfectar únicamente células en división activa, por lo que la eficiencia de la terapia se disminuye en tejidos con baja tasa de división. Con el objetivo de solucionar este inconveniente, **Tao et al** (2004), encontraron que la eficiencia en la transferencia génica usando vectores retrovirales podía ser mejorada hasta en un 35% en células hematopoyéticas, cuando estas recibían previamente el factor derivado estromal  $1\alpha$ .

Un grupo de enfermedades en las cuales se han usado ampliamente estos vectores son las enfermedades lisosomales (**Cabrera-Salazar MA et al.**, 2002), entre las cuales la más estudiada es la mucopolisacaridosis VII (MPS VII) o síndrome de Sly, producto de la deficiencia de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (**Gao C et al.**, 2000). Uno de los resultados más contundentes para esta enfermedad se reportó en el modelo canino tras la administración intravenosa un vector retroviral, obteniéndose, aun después de 17 meses, niveles de expresión 67 veces por encima de los valores normales con una marcada reducción en los depósitos de glicosaminoglicanos (GAG), una recuperación del peso corporal en los animales, pasando del 50 al 84% del valor normal; con la recuperación de la capacidad para caminar y correr, y ausencia de opacidad corneal y daños cardiacos, parámetros usualmente alterados en perros MPS VII (**Ponder K, et al.**, 2002). Esto se convirtió en una de las primeras demostraciones de corrección del defecto genético en un mamífero de mayor tamaño que el ratón, lo que permite pensar que la posibilidad de utilizar esta terapia en humanos esté cada vez más cerca.

Las hemofilias A y B son excelentes modelos para terapia génica, pues no se requiere una elevada expresión del gen, debido a que con concentraciones de los factores superiores al 2% del valor normal es posible obtener un efecto terapéutico apreciable (**Walsh CE**, 2003). **Vanden Driesschen et al.** (1999), reportaron la expresión durante 14 meses del factor de coagulación VIII (FVIII) en ratones con hemofilia A, tras la administración de un vector retroviral vía intravenosa, logrando una corrección del

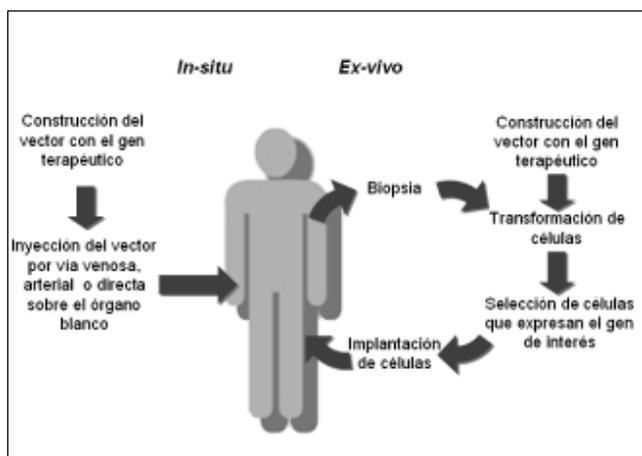
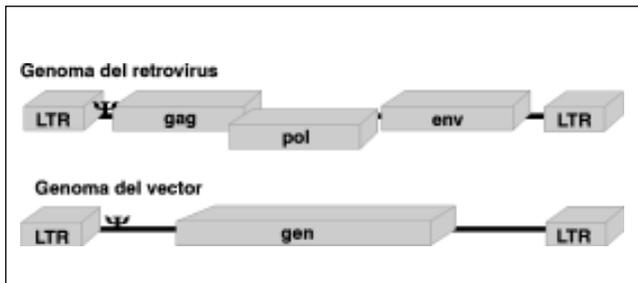


Figura 1. Esquemas de terapia génica *In-situ* y *ex-vivo*.



**Figura 2. Estructura del genoma de un vector retroviral.** Las secuencias de los genes virales gag (proteínas de la cápside), pol (enzimas transcriptasa reversa e integrasa) y env (glicoproteínas de la envoltura) son removidas y cambiadas por el gen terapéutico, conservándose únicamente la señal de empaque ( $\Psi$ ).

fenotipo en el 83% de los ratones que recibieron la terapia, los cuales sobrevivieron a un ensayo de corte de cola.

Los principales vectores retrovirales usados son derivados del virus murino de leucemia, el cual infecta únicamente células en división, por esta razón los vectores basados en lentivirus (un tipo de retrovirus) han ganado gran interés debido a su capacidad para infectar tanto células en división, como en interfase o diferenciadas (Naldini L & Verma IM, 2000). Stein *et al* (2001), utilizaron vectores derivados del virus de inmunodeficiencia felina para el tratamiento *in-vivo* de hemofilia A y MPS VII en modelos murinos, mediante la expresión del dominio B ausente en FVIII y la enzima b-glucuronidasa, respectivamente. En el estudio, 9 de 12 ratones deficientes en FVIII alcanzaron valores del factor superiores a 5 ng/mL (suficiente para convertir un fenotipo de severo en uno moderado), permitiendo una reducción cercana al 50% en la cantidad de sangre perdida en ratones tratados con respecto a los controles. Similarmente, en la totalidad de los ratones con MPS VII tratados la actividad catalítica de la enzima fue detectada durante 11 semanas post-transfección, llegando a niveles hasta del 14% del valor normal tres semanas después de la inyección, con una completa reducción en los depósitos de GAG en hígado y bazo y una notable recuperación de la organización celular.

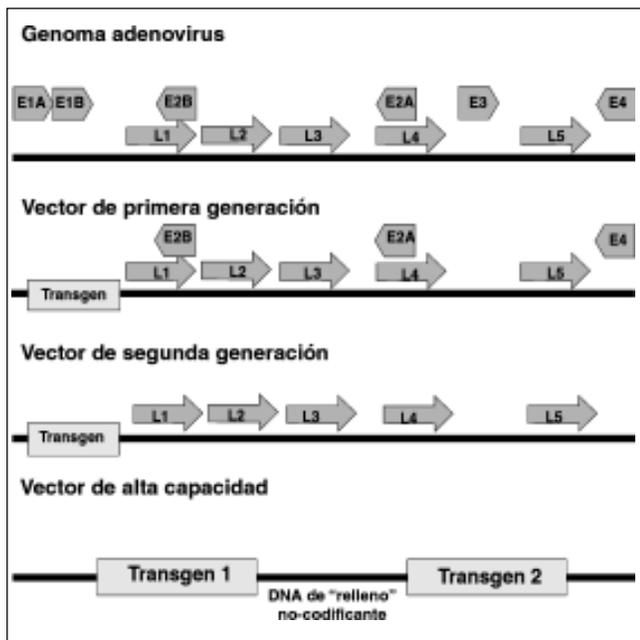
Con el objetivo de aprovechar la ventaja de infectar varios tipos de células y evitar los riesgos de la integración al azar en el genoma del hospedero, se han desarrollado vectores derivados de lentivirus deficientes en integrasa, haciendo que el vector se conserve de manera episomal (extracromosomal) en el núcleo; sin embargo, se requiere la presencia del antígeno T en las células blanco (células preinfectadas con un virus) para lograr que el material genético sea mantenido en la célula y que el gen de interés pueda ser expresado (Vargas J *et al.*, 2004).

Esta nueva estrategia sería de gran utilidad para la entrega de genes suicidas en el desarrollo de terapias contra infecciones virales, sin embargo otros vectores virales que se conservan episomalmente como los adenovirus y los adenoasociados e incluso vectores no virales, han permitido el desarrollo de vacunas e inmunoterapia de una manera más efectiva y segura, sin la necesidad de la presencia de otras secuencias para el mantenimiento de la expresión génica.

### Vectores Derivados de Adenovirus

Los adenovirus (Ad) son virus icosaédricos de 60 a 90 nm de diámetro, con un ADN de doble cadena y un tamaño aproximado de 30 a 40 kb (Templeton NS & Lasic D, 2000). Comprenden más de 50 serotipos humanos diferentes, así como también de primates no-humanos, ratón, perro, cerdo, pollo, pato y otros (Volpers C & Kochanek S, 2004). Una vez el virus infecta la célula, el ADN viral permanece episomalmente en el núcleo dirigiendo la expresión del gen de interés (Vorburger SA & Hunt KK; 2002; St George JA, 2003). Para el desarrollo de los vectores adenovirales de primera generación, la principal estrategia consiste en eliminar las secuencias E1 y E3, necesarias para la expresión de genes encargados de la replicación viral, reemplazándolas por el gen de interés, por lo que es necesaria una línea celular que contenga estas secuencias para la producción de las partículas virales. Los vectores adenovirales de segunda generación poseen deleciones adicionales en E2 y/o E4, mientras que en los de tercera generación o vectores de alta capacidad, todas las secuencias virales han sido removidas (figura 3) (Volpers C & Kochanek S, 2004). En la actualidad es el vector viral más utilizado en ensayos clínicos de TG (Journal of Gene Medicine Clinical Trials Website 2006), siendo los serotipos 2 y 5 los más empleados, debido al amplio conocimiento que se tienen sobre su biología y estructura, además de la disponibilidad de líneas celulares para su producción.

El principal inconveniente de estos vectores es la activación del sistema inmune tras su administración que llevan a una expresión transitoria del gen de interés (Templeton NS & Lasic D, 2000). Con el propósito de comprender los procesos involucrados en esta expresión transitoria varias estrategias han sido utilizadas. La primera consiste en la evaluación de la consecuencia directa de la inyección del vector en modelos animales, detectándose la liberación de citoquinas, interleuquinas, activación de macrófagos, inducción de respuesta de células T y B, liberación de anticuerpos neutralizantes y activación del endotelio (Lowenstein PR, 2004). En un segundo método, desarrollado por Zhang *et al.* (2004), se



**Figura 3. Estructura de los diferentes vectores derivados de adenovirus.** El E1 a E4 (genes tempranos) codifican para transactivadores transcripcionales, proteínas funcionales necesarias para la transformación celular y proteínas necesarias para la replicación viral como la ADN polimerasa, proteína de unión a ADN y la proteína terminal. L1 a L5 (genes tardíos) codifican para todas las proteínas de la cápside.

emplearon conceptos genéticos para descubrir regiones del genoma que puedan tener una relación importante en la expresión de vectores adenovirales en el hígado. En este estudio, se plantea que existen regiones del genoma en las que la activación de sus genes es directamente proporcional a la concentración del vector y que podrían estar involucradas en la generación de respuestas encaminadas al silenciamiento del gen o a la eliminación del vector. Otro factor importante es el efecto de la metilación de sitios CpG, hecho demostrado recientemente tras el análisis cuantitativo del ADN viral y el ARNm, producto de la expresión de un vector con el factor de crecimiento de fibroblastos humanos dirigido por el promotor del citomegalovirus, encontrándose que la relación del número de copias de ARNm por copia de ADN cayó 300 veces para la hora 14 postinyección, indicando una disminución en la tasa de transcripción posiblemente por una alta frecuencia de citosinas metiladas en el extremo 5', el cual es un mecanismo natural de defensa contra transcripción de ADN foráneo. Mediante la evaluación del nivel de metilación fue posible observar que después de 24 horas, el 30% de los sitios CpG en el promotor se encontraban metilados, elevándose a 70% para el séptimo día. Estos resultados sugieren el uso de inhibidores de la

metilación para lograr una expresión a largo plazo (Brooks AR *et al.*, 2004).

Una estrategia para evitar la fuerte respuesta inmune es la construcción de vectores adenovirales de alta capacidad, en los cuales se han removido todas las secuencias virales, conservándose solamente la señal de empaquetamiento ( $\psi$ ) y las repeticiones terminales invertidas (ITRs). Este tipo de vectores pueden recibir hasta 36 kb de ADN no viral, permitiendo la introducción de extensos cDNAs, grandes promotores tejido-específicos y pequeños loci genómicos (Volders C & Kochanek S, 2004). Esta ventaja permitió la expresión constante durante un período de un año, del gen de la distrofina, deficiente en la distrofia muscular de Duchenne, logrando que el 52% de fibras musculares de un modelo murino para esta enfermedad expresaran la proteína, con una mejora notable en la fuerza (10 N/cm<sup>2</sup> en el ratón sin tratar a 25 N/cm<sup>2</sup> en el tratado), en el número de contracciones y una marcada disminución en el daño muscular inducido por estrés mecánico (Dudley RW *et al.*, 2004). Similarmente, Kim *et al.* (2001), lograron la expresión de la apoproteína E (apoE) usando solamente una inyección intramuscular de un vector adenoviral de alta capacidad que permitió la completa y estable corrección de los síntomas de la hipercolesterolemia en un ratón deficiente en apoE durante 2,5 años, con niveles de la proteína entre el 60 y 90% y una concentración plasmática de colesterol inferior a 100 mg/dL (similares a los del control normal), que permitió una aorta libre de lesiones y ausencia de neoplasmas hepáticos en los animales tratados. Sin embargo, aunque estos vectores representan un avance importante en la búsqueda del vector ideal, son necesarios estudios adicionales encaminados a la determinación del riesgo de generación de una respuesta inmune tras la administración de estos vectores de tercera generación, antes de su administración a humanos.

En los últimos años, muchos esfuerzos han estado enfocados a dirigir los vectores adenovirales a receptores específicos en tejidos o células blanco, para lograr la expresión en el órgano de interés, con la reducción de la respuesta del sistema inmune y con ello evitar la posibilidad de generar anti-Ad que reduzcan la concentración del vector y genere inconvenientes para el paciente (Dmitriev IP *et al.*, 2002). Varias estrategias han sido utilizadas para este fin, incluyendo modificación genética o química de la cápside y uso de moléculas adaptadoras que dirigen el vector a receptores diferentes a los que normalmente intervienen en su entrada a la célula (Vorburger SA & Hunt KK, 2002; St George JA 2003; Volders C & Kochanek S, 2004). Wickham *et al.* (1996), desarrollaron un vector

adenoviral dirigido al receptor  $\alpha_v$  para realizar una transferencia génica dirigida hacia endotelio y músculo liso, mediante la asociación del vector con un anticuerpo monoclonal biespecífico, el cual por un lado reconocía un epítipo ubicado en una proteína de la cápside y por el otro el receptor  $\alpha_v$ , lográndose un aumento de la expresión entre siete y nueve veces de  $\beta$ -glucuronidasa, con respecto a la generada por el vector sin el anticuerpo. Similarmente, **Volpers et al.** (2003), construyeron un vector que contiene el dominio de unión a la inmunoglobulina G en una de las proteínas de la cápside, lo que causó un aumento en la selectividad del vector y expresión del gen reportero. De igual manera, el uso de biotina covalentemente unida a un vector adenoviral, con la coadministración del factor de células madre, permitió dirigir el vector específicamente hacia células primarias hematopoyéticas que expresan el receptor c-Kit y como consecuencia un aumento de más de 2000 veces en la expresión del gen reportero (**Smith JS et al.**, 1999).

Otra de las estrategias usadas para mejorar la expresión de los vectores adenovirales es el uso de promotores tejido específicos. En este aspecto, **Martín-Touaux et al.** (2002), encontraron que mediante el uso de un promotor músculo específico para controlar la expresión de la  $\alpha$ -glucosidasa (GAA) en la enfermedad de Pompe, fue posible obtener niveles suprafisiológicos de la enzima 13 semanas post-inyección (786 nmol/h/mg versus 7,5 nmol/h/mg en el control normal), siendo secretada por el músculo al torrente sanguíneo y tomada por otros tejidos, incluyendo el músculo cardíaco, para llevar a una reducción de 10 veces en los depósitos de glucógeno. Uno de los tejidos que esta ganando gran interés para direccionamiento de vectores Ad es el endotelio vascular, por lo que se han evaluado varios promotores específicos para estas células, entre los que se encuentran los promotores para la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), el factor del Willebrand (vWF), la molécula de adhesión intracelular 2 (ICAM-2) y el FLT-1; este último demostró la alta y selectiva expresión de un gen reportero en células endoteliales humanas (**Nicklin SA et al.**, 2001).

### Vectores derivados de virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) son viriones no patogénicos, de aproximadamente 20 a 25 nm de diámetro, compuestos de una mezcla de proteínas de ensamblaje que encapsidan una genoma de ADN de cadena sencilla de aproximadamente 4,7 kb (**Bossis I & Chiorini JA**, 2003). El genoma se encuentra flanqueado por dos ITRs de 145 bases, las cuales contienen el origen de replicación y se-

cuencias requeridas para el empaquetamiento viral (**Zhou X & Muzyczka N**, 1998; **Xiao X et al.**, 1998). Estos virus requieren la coinfección con un virus ayudador, tal como adenovirus o herpesvirus, para producir infección. Hasta el momento se han aislado y caracterizado nueve serotipos diferentes de AAV, cada uno de los cuales posee una afinidad por algún tejido en especial (**Gao G et al.**, 2002). En la actualidad el serotipo 8 combinado con promotores hepato-específicos, ha permitido el desarrollo de modelos de terapia génica para las enfermedades de Gaucher (**Marshall J et al.**, 2004a), Fabry (**Marshall J et al.**, 2004) y Niemann-Pick (**Cheng S et al.**, 2004b), con lo que se ha logrado un aumento hasta de 100 veces en la expresión de las enzimas, con respecto a los valores logrados con el serotipo 2.

Una de las ventajas de estos virus es la capacidad de integrarse al genoma de la célula huésped, lo que podría ofrecer una expresión a largo plazo si se conociera completamente el mecanismo de integración y la estructura del provirus. En los AAV silvestres esta integración ocurre en la posición 19q13.3-qter (locus AAVS1), mediada por la proteína Rep ausente en la mayoría de los vectores derivados de AAV, por lo que estos son encontrados de manera episomal en las células transformadas con vectores de AAV (**Berns KI**, 1996). **Rutledge Y Russell** (1997), establecieron que la integración de vectores AAV no ocurre en todos los casos y cuando existe se encuentran fragmentos del vector en posiciones al azar dentro del genoma del huésped. Diferentes estudios han demostrado que este inconveniente puede ser solucionado por la cotransfección de células con un vector portando el gen *rep* y otro con un gen de interés (**Fisher KJ et al.**, 1996). **Recchia et al.** (1999), coinfectaron células de hepatoma con un vector Ad de alta capacidad portando el gen *rep78* y con otro vector Ad al que se insertó un AAV en el cual se encontraba el gen reportero; lo que resultó en la integración completa del vector AAV en el locus AAVS1. Recientemente, se describió que la integración de vectores AAV ocurre preferiblemente en genes activos que producen deleciones de 2 pb a 0,3 kb y que dichas integraciones, principalmente en intrones, son producto de una microhomología (alrededor de 10 pb) entre los ADN del huésped y del vector (**Nakai H et al.**, 2003).

Los vectores AAV están siendo principalmente usados en enfermedades lisosomales, como los síndromes de Sly, Gaucher, Fabry, Pompe y Sanfillippo (**Cheng SH & Smith AE**, 2003; **Cabrera-Salazar MA & Barranger JA**, 2003). En la enfermedad de Pompe, la construcción de un vector AAV para la expresión de la  $\alpha$ -glucosidasa permitió restaurar la actividad de la enzima tanto *in-vitro* como *in-vivo*, lográndose una expresión estable durante los seis meses posteriores a una inyección intramuscular, con ni-

veles cercanos a los normales y restauración de la actividad muscular (**Fraites TJ et al.**, 2002). **Park** y colaboradores en el 2003, usaron un vector AAV para expresar la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A, deficiente en la enfermedad de Fabry, mediante una inyección intravenosa del vector a un modelo murino, alcanzando valores de actividad enzimática entre 2 y 10 veces los valores normales, con reducción en las acumulaciones lisosomales de glicosfingolípidos en hígado, corazón y bazo, llevando a una recuperación en el peso corporal con respecto a un ratón normal. En la enfermedad de Sly, el uso de vectores AAV mediante inyección intravenosa a ratones Sly recién nacidos, permitió la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa durante 16 semanas en hígado, corazón, bazo, riñón, retina y cerebro, siendo este último de especial interés, pues sin necesidad de procedimientos quirúrgicos complicados fue posible la expresión de la enzima en materia gris, meninges, corteza, vasos, plexus coroide, capa piramidal del hipocampo y molecular del cerebelo, con una marcada reducción de GAG en neuronas parenquimales de la corteza y en meninges, además de la disminución de los depósitos intralisosomales de mucopolisacáridos de los otros órganos (**Daly TM et al.**, 1999).

Al igual que con los otros vectores virales, las hemofiliias han sido incluidas en programas de investigación de TG usando vectores AAV. **Nakai et al.** (1998), expresaron el factor IX, deficiente en hemofilia B, usando un vector AAV bajo el control del promotor EF1 $\alpha$ , con una expresión estable y cercana a los valores normales durante seis meses, lo que logró una notable mejoría en el comportamiento del ratón frente a episodios de sangrado con niveles plasmáticos del factor IX entre 700 y 3200 ng/mL. En otro estudio, perros con hemofilia B recibieron un vector AAV portando el cDNA del factor IX humano, lo que permitió alcanzar niveles de expresión hasta del 12% del valor normal durante los 17 meses del estudio y la normalización de los tiempos de coagulación de los perros, con la desaparición de los episodios de sangrado (**Mount JD et al.**, 2002). De igual manera, **Manno** y colaboradores en el 2003, lograron una notable disminución de los episodios de sangrado en ocho pacientes con hemofilia B, encontraron una baja generación de anticuerpos contra la proteína o el virus y un porcentaje de expresión menor al 1%, suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.

### Métodos y vectores no virales

Debido a los problemas presentados por el uso de vectores virales, las estrategias no virales han sido estudiadas ampliamente, pues carecen principio de los problemas de generación de una fuerte respuesta inmune o

de oncogénesis, además de presentar la ventaja de una fácil producción a gran escala (**Niidome T & Huang L**, 2002). Sin embargo, la eficiencia en la transferencia génica sigue siendo baja con respecto a los valores alcanzados con vectores virales. Dentro de los métodos no virales de transferencia génica se encuentran el ADN desnudo y las asociaciones de ADN con liposomas, polímeros y péptidos catiónicos (**Sáenz H et al.**, 2004).

La forma más fácil de entregar material genético a una célula es mediante el uso de ADN desnudo, el cual puede ser tomado por la célula mediante receptores y resultar en la expresión del gen de interés (**Herweijer H & Wolf JA**, 2003). Sin embargo, la eficiencia de la transferencia se ve afectada por la presencia de nucleasas y fagocitos que limitan la expresión del gen a áreas adyacentes al punto de la inyección (**Niidome T & Huang L**, 2002; **Herweijer H & Wolf JA**, 2003). Las principales técnicas desarrolladas para la administración de ADN desnudo son la electroporación, la biobalística y el ultrasonido, las cuales buscan mejorar la eficiencia de la transferencia lograda por la inyección directa del material genético (**Li S & Ma Z**, 2001).

La electroporación consiste en la aplicación de pulsos de un campo eléctrico sobre las células o el órgano blanco, para mejorar la permeabilidad celular y así permitir el paso del material genético a través de la membrana citoplasmática (**Somiari S et al.**, 2000), lo cual es dependiente de la duración, fuerza y frecuencia del campo eléctrico y del número de pulsos aplicados y la forma del electrodo (**Somiari et al.**, 2002; **Liu F & Huang L**, 2002). La electroporación ha sido empleada en los últimos años principalmente en el área de la inmunología (**Niidome T & Huang L**, 2002). En este campo, **Widera et al.** (2000), demostraron que el uso de electroporación posterior a la inyección de un plásmido en un ratón inmunocompetente, conteniendo el gen para la proteína de superficie Ag del virus de la hepatitis B, permitió títulos superiores a 10000 mIU/mL con tan solo una inmunización (10 mIU/mL es considerado como protector contra infecciones por el virus de la hepatitis B), llevando a un marcado aumento de la respuesta inmune del ratón vacunado. Resultados similares fueron obtenidos por este mismo grupo para la proteína gag del VIH, demostrando que la electroporación permite incrementar la expresión y producir una marcada mejoría en la respuesta inmune.

El ultrasonido, al igual que la electroporación, incrementa la entrada de material genético a la célula mediante la alteración momentánea en la estructura de la membrana celular (**Zarnitsyn VG & Prausnitz MR**, 2004). Usando esta técnica, **Amabile et al.** (2001), demostraron

un incremento hasta de 19 veces en la expresión de un gen reportero en el epitelio vascular, tras la administración de un vector de expresión en células eucariotas y la posterior aplicación de ultrasonido mediante un cateter endovascular. Recientemente se ha reportado la combinación de esta tecnología con agentes de contraste de ultrasonido, conocidos como microburbujas, los cuales permiten aumentar la eficiencia de la transfección hasta 7000 veces con respecto a la aplicación del ultrasonido únicamente (**Taniyama Y et al.**, 2001).

En la biobalística, micropartículas de oro son recubiertas con el material genético y disparadas a la célula u órgano blanco, permitiendo la entrega del vector en el citoplasma e incluso directamente en el núcleo (**Niidome T & Huang L**, 2002). Esta tecnología ha sido usada principalmente en el desarrollo de vacunas tanto humanas como animales (**Zhu W et al.**, 2003; **Li S et al.**, 2004; **Kamili S et al.**, 2004), con el inconveniente de producir una transfección superficial sobre el órgano blanco y por lo tanto restringida a las células adyacentes al lugar de administración (**Kuriyama S et al.**, 2000; **Herweijer H & Wolf JA**, 2003).

En cuanto a los vectores no virales, se han basado en complejos de ADN con lípidos, péptidos o polímeros, los cuales han sido usados para la entrega del material genético tanto *in-vivo* como *ex-vivo* (**Niidome T & Huang L**, 2002). Los liposomas, que consisten de una bicapa lipídica esférica, realizan la entrega del material genético mediante la fusión con la membrana citoplasmática (**Niidome T & Huang L**, 2002). La composición de estos ha variado ampliamente desde principio de los años 90, siendo los compuestos más usados las sales de amonio cuaternario, los derivados catiónicos del colesterol y el diacilglicerol y los lípidos derivados de poliaminas (**Dauty E et al.**, 2001).

El uso de complejos de ADN con péptidos o polímeros, se basa principalmente en la formación de enlaces covalentes con grupos sensibles a oxidación-reducción que son degradados cuando el complejo está en el citoplasma, lo cual libera el ADN y permite la expresión del gen de interés directamente en citoplasma o en el núcleo mediante el uso de señales que dirigen al vector a este compartimiento (**McKenzie DL et al.**, 2000; **Lim YB et al.**, 2000; **Wightman L et al.**, 2001).

### **Terapia génica en los errores innatos del metabolismo**

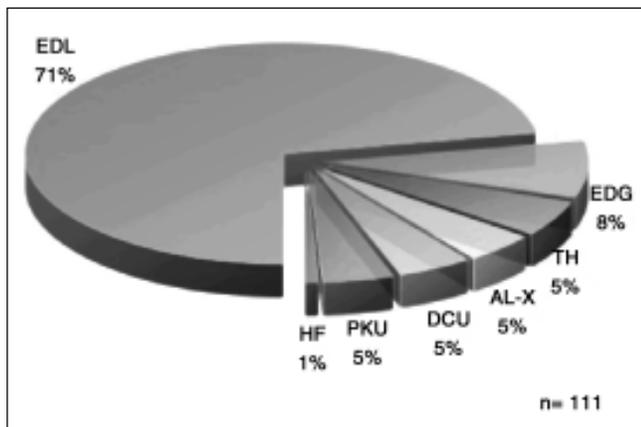
A pesar de ser enfermedades monogénicas en su totalidad, los EIM son considerados enfermedades complejas

debido a que el defecto lleva en muchas ocasiones a la alteración de otras rutas metabólicas, que pueden ser responsables de la variabilidad de fenotipos, incluso entre individuos con la misma enfermedad y mutación (**Lanpher et al.**, 2006). Por otro lado, las bases genéticas son variadas entre los diferentes EIM, muchas de ellas se encuentran altamente caracterizadas desde el punto de vista molecular y en su gran mayoría no necesitan de un control estricto en la expresión del gen aunque si es necesario dirigir la terapia hacia ciertos tipos específicos de células, como las células de Kuffer en la enfermedad de Gaucher o la microglia en la adrenoleucodistrofia ligada al X (ADL-X). Adicionalmente es posible encontrar desórdenes con autonomía celular en las que la célula produce la enzima y no la exporta a la vecinas, como en la adrenoleucodistrofia, o sin autonomía celular en las que la célula afectada puede tomar la enzima de otras células del mismo tejido o de otro tejido lejano, como en las enfermedades de depósito lisosomal (**Lanpher et al.**, 2006).

A pesar del elevado número de EIM, solo unos pocos han sido blanco de estudios de TG, debido a la baja incidencia de la enfermedad o a la disponibilidad de terapias alternas efectivas, como el manejo nutricional en algunos casos. Otro factor importante es la disponibilidad de modelos animales naturales o knockout solo para un número limitado de EIM (**Ellinwood et al.**, 2004).

En ensayos preclínicos 111 estudios han sido realizados (**Cartier N**, 2001; **Mah C et al.**, 2002; **Ding Z et al.**, 2004; **Sun B et al.**, 2005a; 2005b; **Koeberl D et al.**, 2006; **Ghosh A et al.**, 2006; **Sands M & Davidson B**, 2006), de los cuales el 71% corresponde a desórdenes de depósito lisosomal, principalmente a la enfermedad de Sly. Otros EIM estudiados son enfermedades de depósito de glucógeno (principalmente la tipo I o enfermedad de Von Gierke), tirosinemia hepática, adrenoleucodistrofia ligada al X, desórdenes del ciclo de la urea (básicamente la deficiencia de OTC), la fenilcetonuria y la hipercolesterolemia familiar (figura 4).

Tres EIM han sido seleccionados como modelos para el desarrollo de estrategias de TG. El primero de ellos es la enfermedad de Sly o mucopolisacaridosis VII (MPS VII), producto del defecto en el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa que lleva a la alteración del catabolismo de los GAG heparan, dermatan y condroitin sulfato. Se trata de una enfermedad multisistémica con organomegalia y alteraciones del SNC, esqueléticas, cardiovasculares y oculares. Es el EIM con más ensayos preclínicos en TG por varias razones (**Ellinwood et al.**, 2004): (a) estudios preliminares han demostrado que las células transfectadas liberan grandes



**Figura 4.** Ensayos preclínicos realizados en EIM. EDL: Enfermedad de depósito lisosomal, EDG: Enfermedad de depósito de glucógeno, TH: Tirosinemia hepática, ALD-X: Adrenoleucodistrofia ligada al X, DCU: Desórdenes del ciclo de la úrea, PKU: Fenilcetonuria, HF: Hipercolesterolemia familiar.

cantidades de enzima recombinante al medio la cual puede ser tomada por células no transfectadas, (b) altos niveles de enzima parece no tener efectos adversos, aunque existe un reporte en el que se indica que niveles suprafisiológicos de la enzima pueden llevar a la aparición de hepatocarcinomas producto de la formación de cristales de la proteína en el interior de las células, (c) no hay evidencia de la necesidad de una estricta regulación de la expresión génica, (d) la enzima recombinante es fácilmente distinguible de la enzima de los modelos animales, y (e) niveles entre el 5 y 10% permiten pasar de un fenotipo severo a uno medio o tardío, con disminución del compromiso visceral.

Otro de los EIM que aunque no es uno de los que posee un gran número de estudios se ha ido lentamente convirtiendo en excelente modelo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, es la ALD-X, el desorden más frecuente de alteración de la mielina en el cerebro. ALD-X se encuentra asociada a la acumulación de VLCFA y es un desorden en el que se observa la demielinización de áreas específicas y limitadas del cerebro. La principal razón para que la ALD-X sea un modelo para el manejo de enfermedades neurodegenerativas, radica en el hecho de disponer de un intervalo de tiempo en el que a pesar de haberse realizado el diagnóstico, el paciente no ha mostrado ningún síntoma de la enfermedad. Adicionalmente existen evidencias sobre correcciones transitorias del defecto tras trasplante de médula ósea (Cartier N, 2001).

Los inconvenientes en el desarrollo de terapias para esta enfermedad son producto de la especificidad de áreas

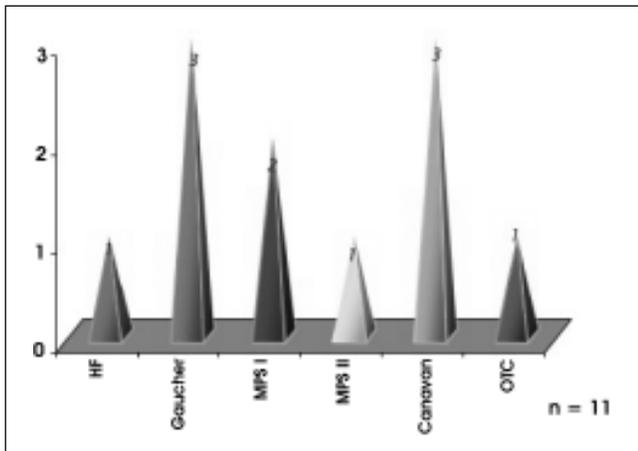
y células del cerebro afectadas. Se ha identificado que las células blanco serían la microglia, que podrían ser corregidas con trasplante de células madre derivadas de médula ósea transfectadas con un vector lentiviral, y células de la glia que deberían ser corregidas tras administración *in-situ* del vector. Para completar el escenario, la proteína afectada no es secretada y las células transfectadas no presentan ninguna ventaja selectiva sobre las células deficientes, por lo que teóricamente se debería corregir en un alto porcentaje cada una de las células afectadas. De todas formas estudios realizados *in vitro* y en modelos murinos, han mostrado la posibilidad de corregir el defecto tanto TG *ex vivo* como por administración directa del vector (Cartier N, 2001).

Finalmente tenemos la fenilcetonuria, producto del defecto en la enzima fenilalaninohidroxilasa y que lleva a elevados niveles de fenilalanina (Phe) en sangre, con un marcado retardo mental como el principal signo de la enfermedad. Aunque para esta enfermedad se dispone de tratamiento nutricional, es difícil que los pacientes sigan estrictamente la dieta, siendo necesario el desarrollo de métodos alternativos para mantener bajos los niveles plasmáticos de Phe, siendo la TG una de estas estrategias (Ding Z *et al.* 2004). Oh H *et al.* (2004), demostraron la posibilidad de corregir el defecto mediante el uso de un vector AAV portando el cDNA de la fenilalaninohidroxilasa, logrando mantener los niveles de Phe dentro de un rango normal durante las 25 semanas del estudio, con una marcada mejoría en el fenotipo del ratón, siendo la principal característica el retorno del color oscuro en el pelo y la cola de los ratones que recibieron los vectores. El único inconveniente fue la vía de administración, pues solo la administración intraportal permitió alcanzar niveles terapéuticos de la enzima.

En cuanto a los protocolos clínicos de EIM tan solo 11 se han realizado y ninguno de ellos ha superado la fase clínica I (Journal of Gene Medicine Clinical Trials Website, 2006). Protocolos para Hipercolesterolemia familiar, Enfermedad de Gaucher, MPS I y II, Enfermedad de Cannavan y deficiencia de OTC. En la actualidad, solo uno de los protocolos para la enfermedad de Cannavan se encuentra abierto y en fase I (figura 5).

### Consideraciones éticas

Desde el momento mismo del planteamiento de la TG por Joshua Lederberg y Edward Tatum en 1966, varios hechos han llevado a importantes discusiones éticas por parte de la comunidad científica, los organismos regulatorios y la sociedad en general.



**Figura 5.** Ensayos clínicos realizados en EIM. HF: Hipercolesterolemia familiar, MPS: Mucopolisacaridosis, OTC: Deficiencia de ornitintrascarbamilasa.

El primero de ellos ocurrió en 1980, cuando en Italia e Israel se intentó desarrollar un protocolo de TG en dos pacientes con  $\beta$ -talasemia, cuando la tecnología era muy prematura para la época, por lo que el grupo fue censurado por el NHI, por experimentos con ADN recombinante sin autorización. Esto llevó a que entre 1981 y 1982 se realizara un análisis ético definitivo sobre la TG, generándose el primer documento oficial sobre ingeniería genética en humanos (**American Society of Gene Therapy Website**, 2006).

A raíz de estos informes, en cualquier protocolo de TG se deben tener en cuenta los siguientes aspectos (**Walters L & Palmer G**, 1997): (a) la enfermedad que se va a tratar, (b) qué alternativas de tratamiento existen para la enfermedad, (c) qué riesgos probables existen para el paciente, (d) cuál es el beneficio potencial, (e) cómo se seleccionan los pacientes, (f) cómo se garantiza un efectivo consentimiento informado, y (g) cómo se garantiza el anonimato de los pacientes?

Sin embargo dos hechos cambiaron notablemente el panorama de la TG. El primero de ellos fue la muerte de Jessie Gelsinger en 1999. Jessie era un paciente de 18 años con deficiencia parcial de la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC), la cual había sido manejada exitosamente mediante restricciones dietarias durante toda su vida, con los típicos problemas asociados para él y su familia.

Cuando Jessie cumplió los 18 años, voluntariamente ingresó en el protocolo de TG ofrecido por el Instituto de Terapia Génica Humana (IHGT) de la Universidad de

Pensilvania. Él recibió, vía intraportal, una dosis de  $3,8 \times 10^{13}$  partículas de un vector adenoviral de primera generación portando el cDNA de la OTC. Sin embargo, cuatro días después Jessie murió producto de un shock sistémico y el análisis postmortem reveló en hígado infiltración de linfocitos, activación de linfocitos T, formación de anticuerpos anti-Ad, citocinas proinflamatorias, pérdida de células transfectadas y daño endotelial (**St George JA**, 2003). Esta se convirtió en la primera y única muerte asociada a un protocolo de terapia génica. (**NIH Report**, 2002, **George JA**, 2003, **Volpers C. & Kochanek S**. 2004).

La forma intermedia de la enfermedad, presentada por Jesse Gelsinger, puede ser manejada, sin que llegue a curarse, con dieta y suplemento de fármacos (**Barrera LA et al.**, 2004), lo cual le proporcionaría una expectativa de vida cercana a los 50 años. Sin embargo, existe una forma severa de esta entidad que afecta a los recién nacidos, en cuyo caso la expectativa de vida es mínima. El primer interrogante ético que puede plantearse alrededor de este caso es por qué preferir adelantar protocolos en individuos que pueden vivir, aunque sea de manera limitada y supeditada a un tratamiento de soporte, con respecto a pacientes que tienen escasas posibilidades de vida pues no existe ninguna terapia efectiva para su enfermedad y cuál es la relación perjuicio-beneficio potencial en cada uno de los casos?

El hecho de que un recién nacido no pueda firmar el consentimiento informado se ha convertido en un obstáculo para incluir estos pacientes en los protocolos de TG, la pregunta a resolver sería, qué es más importante, el consentir o el daño potencial a la vida del individuo? Indudablemente, esto es algo que debe ser revisado cuidadosamente por los comités de ética.

Si bien es cierto que los pacientes que se incluyen dentro de protocolos clínicos experimentales, facultan a los investigadores para que lo hagan mediante el consentimiento informado, este documento será válido únicamente en la medida en que el paciente haya sido adecuadamente informado y comprenda los antecedentes, riesgos y limitaciones del procedimiento. En el caso de Jesse Gelsinger el texto inicial del consentimiento informado, revisado por el NIH, mencionaba la muerte por toxicidad de animales de experimentación (monos rhesus), detalles que fueron omitidos en la versión final (**Savulescu J**, 2001). Adicionalmente los voluntarios fueron invitados a participar mediante un sitio Web que señalaba el empleo de bajas dosis y promisorios resultados. Sin embargo, el procedimiento experimental presentó una serie de cambios condenables éticamente. Así por ejemplo, a

pesar que el Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) de Estados Unidos, recomendó que el mismo vector fuera suministrado en forma intravenosa, los ensayos se realizaron con inyección directa al hígado. El paciente recibió  $3.8 \times 10^{13}$  partículas adenovirales que contenían el gen humano para corregir el defecto genético. Esta concentración, la más alta empleada en cualquier protocolo de terapia génica, fue usada aparentemente porque los investigadores subestimaron la virulencia del vector, ya que éste había permanecido almacenado durante 25 meses (Savulescu J, 2001).

Otro aspecto que no puede escapar al análisis y que ha dado lugar a varios cuestionamientos y regulaciones, es el conflicto de intereses. A pesar que el protocolo se adelantaba en el IHGT, alguno de los investigadores y miembros de la Universidad de Pensilvania responsables del proyecto, tenían patentes sobre aspectos de la tecnología empleada y James Wilson, el director del grupo, al igual que algunos de sus colaboradores tenían intereses en Genovo, la compañía de biotecnología que apoyaba el proyecto y producía los vectores (Savulescu J, 2001).

La mayoría de la comunidad científica estuvo de acuerdo en que se trató de una reacción inusual, comparada con los demás participantes, pero que se presentó como respuesta a la alta dosis del vector. Aun cuando indudablemente en todo procedimiento clínico existen riesgos y la posibilidad de muerte de un paciente es una potencialidad presente en todo acto médico, queda la duda si la suerte de Jesse Gelsinger hubiese sido la misma de no existir toda esa serie de eventos irregulares en el procedimiento.

Finalmente el NIH y el RAC emitieron una serie de guías y recomendaciones encaminadas a maximizar la seguridad de la investigación básica y proveer lineamientos para el adecuado diseño de investigaciones preclínicas y clínicas en TG (NIH Report, 2002).

El segundo caso importante se presentó en el protocolo adelantado por el Dr Alan Fisher, en el que se estaba tratando nueve pacientes para el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa ligada al X (SCID-X), enfermedad producto de alteraciones en el receptor de citoquinas  $\gamma_c$ , que lleva a que los pacientes presentes problemas inmunes por deficiencia en la maduración de linfocitos y células NK, y que de no ser tratados mueren muy poco después del nacimiento. Este grupo en el 2000, habían reportado la primera corrección completa de un defecto genético en humanos mediante un protocolo de TG, al administrar células madre hematopoyéticas autólogas transfectadas con un vector retroviral, a dos pacientes de

11 meses con SCID-X (Cavazzana-Calvo M *et al.*, 2000). Sin embargo, en 2003 se prendieron nuevamente las alarmas, con el reporte de la aparición de una condición similar a leucemia en dos de los pacientes que habían recibido la terapia. Este efecto adverso fue asociado a la inserción del vector en el locus LMO-2, del cual se sabía previamente que su expresión errada llevaba a la producción de una oncoproteína (Hacein-Bey-Abina S *et al.*, 2003). Estudios posteriores revelaron que adicionalmente el gen mismo de  $\gamma_c$  funcionaba como un activador cuando estaba bajo el control del promotor viral. El protocolo fue suspendido y los dos pacientes fueron sometidos a quimioterapia, mientras que en los individuos restantes no se encontró ningún efecto adverso y en la actualidad llevan una vida normal (American Society of Gene Therapy Website, 2006).

La posibilidad de que el ADN se incorporara en un sitio erróneo del genoma y causara la activación de oncogenes o la supresión de otros, se había vislumbrado desde los albores de la terapia génica, pero hasta ese momento no se había presentado este tipo de complicaciones en animales o en humanos. Igualmente el hecho de que esta integración sea al azar es algo que ha desatado un gran debate y actualmente es un blanco importante de investigación. Independientemente, los organismos americanos y europeos incrementaron los controles sobre los protocolos con vectores retrovirales, que se manifestó en la reducción del número de protocolos clínicos aprobados con estos vectores (Edelstein ML *et al.*, 2004).

### Consideraciones finales

Uno de los grandes interrogantes a resolver desde el punto de vista ético es el posible uso de la terapia génica en células germinales: óvulos o espermatozoides con el fin de que la corrección se transmita a la descendencia.

La TG de células somáticas, (diferentes a los gametos) para el tratamiento de enfermedades incurables puede considerarse aceptable éticamente porque no va en contra de los principios fundamentales de beneficencia y justicia y porque su aplicación no presenta problemas éticos diferentes a los de cualquier otro tipo de terapia experimental tales como la utilización de nuevos fármacos o de técnicas quirúrgicas novedosas. Sin embargo, sólo se debería intentar cuando no hay otras alternativas terapéuticas mejores y ante la evidencia de que es técnicamente posible, segura y benéfica para el paciente.

El uso de células germinales como blanco de la terapia, brinda la posibilidad de transmitir a futuras generaciones la corrección génica, pero no existe la manera de

predecir los problemas resultantes de esta inserción (Walters L, 1999), razón por la cual la misma comunidad científica internacional propuso una moratoria para su uso en el año de 1972 y actualmente se encuentra prohibida por las entidades regulatorias Europeas y Norteamericanas. Sin embargo, existen buenas razones para hacer terapia génica en células germinales, pues puede ser más efectiva que la repetida administración de una terapia somática generación tras generación, a la vez que se le ofrece a las familias la posibilidad de liberarse de una enfermedad y del temor al riesgo de tener un hijo enfermo o portador (Walters L & Palmer, 1997).

El papel potencial de la manipulación de la línea germinal para la prevención de enfermedades genéticas es mucho menos claro que el de la modificación somática, ya que no conocemos con certeza si existen efectos impredecibles en las generaciones futuras o los efectos a largo plazo que pudieran cambiar las características genéticas de las poblaciones humanas. Por otro lado, algunos consideran que esta sería aceptable siempre y cuando se cumplan algunas condiciones, tales como la existencia de experiencia previa en la TG somática que establezca claramente la efectividad y seguridad del tratamiento de células somáticas, que existan los estudios adecuados en modelos animales que aseguren la reproducibilidad, factibilidad y seguridad de la TG germinal utilizando los mismos vectores de transferencia génica y procedimientos que eventualmente se utilizarían en seres humanos. Sin embargo, dado que la TG germinal está llena de incertidumbres técnicas y éticas, por lo pronto no debe llevarse a cabo.

Para algunas enfermedades, como las neurodegenerativas o lisosomales con compromiso del SNC, se ha evidenciado que el daño sobre el cerebro empieza a desarrollarse varias semanas antes del nacimiento. En estos casos, la terapia génica *in-utero* probablemente no se diferenciaría de otros procedimientos clínicos realizados prenatalmente, pero sería necesario demostrar que el mismo efecto no se podría lograr con una terapia neonatal (Nevin NC, 2000).

Es importante destacar que en la actualidad las enfermedades genéticas son muy difíciles de tratar y curar mediante una sola aproximación terapéutica y que quizás en el futuro cercano tendrá que usarse una combinación de terapia de reemplazo enzimático, inhibición de síntesis de sustratos, terapia génica y trasplante de células, para lograr resultados eficientes y estables a largo plazo.

Los reveses encontrados en los últimos años han servido para volver los ojos a la investigación básica

involucrada en estos procesos, con el fin de hacer de la terapia génica un método más seguro y eficaz en el futuro. A raíz de los inconvenientes encontrados en los pacientes que estaban sometidos a terapia génica en París y en Pensilvania, se suspendieron los protocolos en que ellos estaban involucrados y otros similares que se estaban realizando en Estados Unidos y Gran Bretaña. Sin embargo el número de laboratorios alrededor del mundo que están trabajando en estos procedimientos se calcula cercano a los 2000. En resumen, el equilibrio entre el daño incierto y los beneficios deseados ha sido examinado y ponderado desde instancias religiosas, éticas y del interés público, llegándose a la conclusión de que los estudios y aplicación de la manipulación genética somática realizada con fines terapéuticos deben proseguir.

Con el fin de contribuir a la búsqueda de soluciones terapéuticas para enfermedades genéticas como los EIM, desde hace algunos años el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana, ha enfocado parte de sus esfuerzos a la investigación en terapia génica y terapia de reemplazo enzimático para enfermedades lisosomales. Se han adelantado estudios de transferencia génica para los síndromes de Hunter y Morquio A, logrado la construcción de un casette de expresión episomal para la IDS, deficiente en la enfermedad de Hunter. Esto ha permitido la reparación *in-vitro* del defecto en células provenientes de un paciente con enfermedad de Hunter (Gutiérrez M, *et al.*, 2001). Por otro lado, mediante el uso de un vector AAV que expresaba la enzima GALNS bajo el control del promotor del citomegalovirus, se logró corregir *in-vitro* la deficiencia enzimática en fibroblastos de un paciente con síndrome de Morquio A, usando un sistema de producción de AAV recombinantes libre de adenovirus y con un elevado título de partículas virales (Barrera LA, 2003). Actualmente se están evaluando dos promotores eucarióticos, con el objetivo de mantener la expresión de la enzima durante un mayor intervalo de tiempo y se espera seguir profundizando en esta área para que en un mediano plazo podamos ofrecer a los pacientes con estas enfermedades, una terapia más duradera, segura y eficaz.

## Bibliografía

- Amabile, P. G., J. M. Waugh, T. N. Lewis. 2001. High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 37: 1975-1980. American Society of Gene Therapy Website: <http://www.asgt.org>.
- Bagley, J., J. Iacomini. 2003. Gene therapy progress and prospects: gene therapy in organ transplantation. *Gene Ther* 10: 605-611.

- Barrera, LA.** 2003. Desarrollo de un modelo de vectores usando virus adenoasociados libre de adenovirus para corregir la deficiencia enzimática en las mucopolisacaridos. IV Congreso de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Octubre 24-27. Iguazú, Argentina.
- , **Sáenz, H., Cuellar, Y.M., Ospina, S., Garzón, K., Cabrera, MA., Márquez, W., Torres, AL.** 2004. Manual de Enfermedades Metabólicas. Editorial Panamericana SA. Bogotá. 250 p.
- Berns, KI.** Parvoviridae: The viruses and their replication *in*: Fields Virology. Fields, BN., Knipe, DM., Howley, PM. Lippincott – Raven Publishers. Philadelphia. 1996. pp 2173-2192.
- Bossis, I., Chiorini, JA.** 2003. Cloning of an avian adeno-associated (AAAV) an generation of recombinant AAAV particles. *J Virol* **77**: 6799-6810.
- Braun, SE., Aranovich, EL., Anderson, RA., Crotty, PL., McIvor, RS., Whitley, CB.** 1993. Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate –2- sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:11830–11834.
- Brooks, AR., Harkins, RN., Wang, P.** 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* **6**: 395-404.
- Burton, EA., Glorioso, JC., Fink, DJ.** 2003. Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease. *Gene Ther* **10**: 1721-1727.
- Cabrera-Salazar, MA., Novelli, E., Barranger, JA.** 2002. Gene therapy for the lysosomal storage disorders. *Curr Opin Mol Ther* **4**: 1464-8431.
- , **Barranger, JA.** 2003. Lysosomal Storage disorders: gene therapy. *Nature Encyclopedia of the Human Genome* pp. 757-766.
- Cartier, N.** 2001. Gene therapy strategies for X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Mol Ther* **3**: 357-361.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., & Fischer, A.** 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. **288**: 669-672.
- Chao, H., Mansfield, GS., Bartel, RC.,** 2003. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* **9**: 1015-1019.
- Cheng, SH., Smith, AE.** 2003. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther* **10**: 1275-1281.
- , **Ziegler, R., Barbon, S., Disnick, R., Schuchman, E.** 2004. Efficacy of AAV-mediated expression of ASM in Niemann-Pick B mice. *J Inherit Metab Dis* **27(suppl 1)**: 162.
- Collins, J., Herman, P., Schuch, C., Babgy, G.** 1992. cmyc antisense oligonucleotides inhibit the colony-forming capacity of Colon 320 colonic carcinoma cells. *J. Clin Invest* **89**: 1523-1527.
- Daly, TM., Vogler, C., Levy, B.** 1999. Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2296-2300.
- Dauty, E., Remy, JS., Blessing, T., Behr, JP.** 2001. Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture. *J Am Chem Soc* **123**: 9227–9234.
- DiFerrante, NM., Nichols, BL., Jr., Donnelly, PV., Neri, G., Hrgovcic, R., Berglund, RK.** 1971. Induced degradation of glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's syndromes by plasma infusion. *Proc Nat Acad Sci USA* **68**: 303-307.
- Dimitriev, IP., Kashentseva, EA., Curieh, DT.** 2002. Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol* **76**: 6893-6899.
- Ding, Z., Harding, C., Thöny, B.** 2004. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab* **81**: 3-8.
- Dudley, RWR., Lu, Y., Gilbert, R.** 2004. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into *mdx* mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther* **15**: 145-156.
- Edelstein, ML., Adeb, MR., Wixon, J., Edelstein, RM.** 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 – an over view. *J Gene Med* **6**: 597-602.
- Ellinwood, NM., Vite, C., Haskins, M.** 2004. Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med* **6**: 481-506.
- Felgner, JH., Kumar, R., Sridhar, CN., Wheeler, CJ., Tasi, YJ., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, PL.** 1994. Enhanced gene delivery system and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* **269**: 2550-2561.
- Fisher, KJ., Kelley, WM., Burda, JF.** 1996. A novel adenovirus- adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Hum Gene Ther* **7**: 2079-2087.
- Fraites, TJ., Schleissing, MR., Shanelly, RA.** 2002. Correction of the enzymatic and functional deficits in a model of pompe disease using adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* **5**: 571-578.
- Gao, C., Sands, MS., Haskins, ME., Ponder, KP.** 2000. Delivery of a retroviral vector expressing human  $\alpha$ -glucuronidase to the liver and spleen decreases Lysosomal storage in mucopolysaccharidosis VII mice. *Mol Ther* **2**: 233-244.
- Gao, G., Alvira, MR., Wang, L.** 2002. Novel adeno-associated virus from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11854-11859.
- García, F., Barrera, LA.** 2001. La terapia génica. *Innovación y ciencia* **3-4**: 88-97.
- García-Blanco, MA.** 2003. Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Clin Invest* **112**: 475-480.
- Gaspar, HB., Howe, S., Thrasher, AJ.** 2003. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Gene Ther* **10**: 1999-2004.

- Ghosh, A., Allamarvdasht, M., Pan, C.J., Sun, M.S., Mansfield, B.C., Byrne, B.J., Chou, J.Y. 2006. Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther* **13**:321-329.
- Griesenbach, U., Ferrari, S., Geddes, D.M., Alton, EFWF. 2002. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* **9**: 1344-1350.
- Groves, K.A., Barnett, S.C., Franklin, R.J.M., Noble, M. 1993. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitors cells. *Nature* **362**: 453-455.
- Gutiérrez, M.A., Cerón F., García, F., Barrera, L.A. 2001. Construcción y evaluación de un vector de expresión episomal conteniendo el cDNA de la IDS para corregir la deficiencia enzimática en fibroblastos de paciente con síndrome de Hunter. III Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Octubre 21-24. Cartagena, Colombia.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kallen, C., Schmidt M. 2003. A Serious adverse event alter successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**: 255-256.
- Harris, J.D., Lemoine, N.R. 1996. Strategies for targeted gene therapy. *Trends in Genet* **12**: 400-404.
- Herweijer, H., Wolff, J.A. 2003. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**: 453-458.
- Hilman, B.C., Sorensen, R.U. 1994. Management Options: SCIDS with Adenosine Deaminase Deficiency. *Ann Allergy* **72**: 395-402.
- Journal of Gene Medicine Clinical Trials Website: [www.wiley.co.uk/wileychi/genmed](http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed).
- Kamili, S., Spelbring, J., Carson, D., Krawczynski, K. 2004. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis* **189**: 258-264.
- Kay, M.A., Liu, D., Hoogerbrugge, P.M. 1997. Gene Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12744-12746.
- Kim, I., Józkwicz, A., Piedra, P.A. 2001. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13282-13287.
- Koeberl DD, Sun BD, Damodaran TV, Brown T, Millington DS, Benjamin, D.K., Jr, Bird, A., Schneider, A., Hillman, S., Jackson, M., Beaty, R.M., Chen, Y.T. 2006. Early, sustained efficacy of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy in glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther*. **13**: 1281-1289.
- Kuriyama, S., Mitoro, A., Nakatani, T. 2000. Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther* **7**: 1132-1136.
- Lacadena, J.R. 2001. Terapia Génica. Consideraciones éticas. (N.I.C.E). <http://cerzopntic.mec.es/jlacaden/presenOO.html>.
- Lanpher, B., Brunetti-Pierri, N., Lee, B. 2006. Inborn errors of metabolism: the from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet*. **7**: 449-460.
- Li, B.W., Rush, A., Zhang, S.R. 2004. Antibody responses to Brugia malayi antigens induced by DNA vaccination. *Filaria J* **22**: 1-8.
- Li, S., Ma, Z. 2001. Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **1**: 201-226.
- Lim, Y.B., Han, S.O., Kong, H.U. 2000. Biodegradable polyester, poly[a-(4-aminobutyl)-Lglycolic acid], as a non-toxic gene carrier. *Pharm Res* **17**: 811-816.
- Liu, F., Huang, L. 2002. A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA an electrotransfer. *Mol Ther* **5**: 323-328.
- Lowenstein, P.R. 2004. Immunological needles in the gene therapy haystack: applying a genetic paradigm to gene therapy. *Gene Ther* **11**: 1-3
- Mah, C., Cresawn, K.O., Fraites, T.J. Jr, Pacak, C.A., Lewis, M.A., Zolotukhin, I., Byrne, B.J. 2002. Sustained correction of glycogen storage disease type II using adeno-associated virus serotype 1 vectors. *Gene Ther*. **12**: 1405-1409.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S. 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963-2972.
- Marshall, J., McEachern, K., Nietupski, J., Cavangh, J., Grabowski, Cheng, S.H. 2004a. AAV-mediated gene therapy of a murine model of Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*. **27(suppl 1)**: 160.
- Marshall, J., Ziegler, R., Barbon, C., Bercury, Cheng, S.H. 2004b. Efficacy following AAV2/8-mediated expression of  $\alpha$ -galactosidase A in Fabry mice. *J Inherit Metab Dis*. **27(suppl 1)**: 173.
- Martín-Touaux, E., Puech, J.P., Château, D. 2002. Muscle as a putative producer of acid  $\alpha$ -glucosidasa for glycogenosis type II gene therapy. *Hum Mol Genet* **11**: 1637-1645.
- McKenzie, D.L., Kwok, K.Y., Rice, K.G. 2000. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J Biol Chem* **275**: 9970-9977.
- McKinnis, E.J., Sulzbacher S., Rutledge, J.C., Sanders, J., Scott, C.R. 1996. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *J Pediatr* **129**: 145-148.
- McNeish, I.A., Bell, S.J., Lemoine N.R. 2004. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using suppressor genes. *Gene Ther* **11**: 497-503.
- Min, J.J., Gambhir, S.S. 2004. Gene therapy progress and prospects: Noninvasive imaging of gene therapy in living subjects. *Gene Ther* **11**: 115-125.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, M. 2002. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-direct gene therapy. *Blood* **99**: 2670-2675.
- Nakai, H., Herzog, R.W., Hagstrom, N. 1998. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver *Blood* **91**: 4600-4607.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess S. 2003. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* **14**: 297-302.
- Naldini, L., Verma, I.M. 2000. Lentiviral vectors. *Adv Virus Res* **55**, 599-609.
- Neufeld, E.F., Muenzer, J. Mucopolysaccharidosis in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. Scriver, C.R.,

- Beaudet A.L., Sly W.S. & Valle D. (eds). McGraw-Hill. New York. 2001. 3421-3452.
- Nevin, NC.** 2002. What has happened to gene therapy? *Eur J Pediatr* **159** (Suppl 3):S240-S242.
- Nicklin, SA., Buening, H., Dishart, KL.** 2001. Efficient and selective AAVs-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* **4**: 174-181.
- NIH Report.** 2002. Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum Gene Ther* **13**: 3-13
- Niidade, T., Huang, L.** 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* **9**:1647-1652.
- Oh, H., Park, E., Kang, S., Jo, I., Jung, S.** 2004. Long-term enzymatic and phenotypic correction in the phenylketonuria mouse model by adeno-associated virus vector-mediated gene transfer. *Pediatr Res.* **56**: 1-7.
- Orkin, L.** 1995. Report and Recommendations of the Panel to Assess the NIH Investment in Research on Gene Therapy. Distributed by the National Institutes of Health. Bethesda. MD. Available: www.nih.gov. Dec. 07.
- Park, J., Murray, GJ., Limaye, A.** 2003. Long-term correction of globotriaosylceramide storage in Fabry mice by recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3450-3454.
- Ponder, KP., Melniczek, JR., Xu, L.** 2003. Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13102-13107.
- Puttaraju, M., DiPasquale, J., Baker, CC.** 2001. Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Therp.* **4**: 105-114.
- Recchia, A., Parks, RJ., Lamartina, S.** 1999. Site-specific integration mediated by hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2615-2620.
- Rutledge, EA., Russell, DW.** 1997. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* **71**: 8429-8436.
- Sáenz, H., Gutiérrez, MA., Barrera, LA.** 2004. Terapia génica con vectores virales para el tratamiento de mucopolisacaridosis y otras enfermedades genéticas. *Universitas Medica* **45**: 22-31.
- Sands, M., Davidson, B.** 2006. Gene Therapy for Lysosomal Storage Diseases. *Mol Ther* **13**: 839-849.
- Sapolsky, R.** 2003a. Altering behaviour with gene transfer in the limbic system. *Physiol Behav.* **79**: 479-490.
- \_\_\_\_\_ 2003b. Gene therapy for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* **162**: 208-220.
- Savulescu, J.** 2001. Harm, ethics committees and gene therapy death. *J Med Ethics* **27**: 148-150.
- Smith, A.E.** 1995. Viral vectors in gene therapy. *Ann Rev Microbiol* **49**:807-838.
- Smith, JS., Keller, JR., Lohrey, NC.** 1999. Redirected infection of directly biotinylated recombinant adenovirus vectors through cell surface receptors and antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8855-8860.
- Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, JJ.** 2000. Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* **3**:249-255.
- St George, JA.** 2003. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* **10**: 1135-1141.
- Stein, CS., Kang, Y., Sauter SL.** 2001. *In Vivo* treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors. *Mol Ther* **3**: 850-856.
- Sun, B., Zhang, H., Franco, LM., Brown, T., Bird, A., Schneider, A., Koeberl, DD.** 2005a. Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-associated virus vector containing a muscle-specific promoter. *Mol Ther* **11**: 889-898.
- \_\_\_\_\_ **Zhang, H., Franco, LM., Young, SP., Schneider, A., Bird, A., Amalfitano, A., Chen, YT., Koeberl, DD.** 2005b. Efficacy of an adeno-associated virus 8-pseudotyped vector in glycogen storage disease type II. *Mol Ther* 2005 **11**: 57-65.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K.** 2002. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* **105**: 1233-1239.
- Tao, W., Hangoc, G., Cooper S., Bosmeyer, HE.** 2004. SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 enhances retroviral-mediated gene transfer into immature subsets of human and murine hematopoietic progenitor cells. *Gene Ther* **11**: 61-69.
- Templeton NS and Lasic D.** 2000. Gene therapy. Therapeutic mechanisms and strategies. Marcel Dekker, Inc. New York. 584 p.
- Themis, M., May, D., Coutelle, C., Newbold, RF.** 2003. Mutational effects of retrovirus insertion on the genome of V79 cells by an attenuated retrovirus vector: implications for gene therapy. *Gene Ther* **10**: 1703-1711.
- VandenDriessche, T., Vanslebrouck, V., Goovaerts, I.** 1999. Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after *in vivo* retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10379-10384.
- Vargas, J., Gusella, GL., Najfeld, V.** 2004. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* **15**: 361-372.
- Volpers, C., Kochanek, S.** 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6**: S164-S171.
- \_\_\_\_\_ **Thirion, C., Biermann, V.** 2003. Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *J Virol* **77**: 2093-2104.
- Vorburger, SA., Hunt, KK.** 2002. Adenoviral gene therapy. *The Oncologist.* **7**: 46-59.
- Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R., Birnstiel, ML.** 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4255-4259.
- Walsh, CE.** 2003. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for the hemophilias. *Gene Ther* **10**: 999-1003.
- Walters, L.** 1999. Ethical issues in human gene therapy. *Human Genome News* **10**: 16-17.

- \_\_\_\_\_ **Palmer, JG.** 1997. The ethics of human gene therapy. Oxford University Press, New York. pp. 60-98.
- Wheeler, CJ., Felgner, PL., Tsai, YJ., Marshall, J., Sukhu, L., Soeun, GH., Hartikka, J., Nietupski, J., Manthorpe, M., Nichols, M., Plewe, M., Liang, X., Norman, J., Smith, A., Cheng, SH.** 1996. A novel cationic lipid greatly enhances plasmid delivery and expression in mouse lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11454-11459.
- Wickham, TJ., Segal, DM., Roelvink, PW.** 1996. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using biospecific antibodies. *J Virol* **70**: 6831-6838.
- Widera, G., Austin, M., Rabussay, D.** 2000. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol* **164**: 463-4640.
- Wightman, L., Kischeis, R., Rössler, V.** 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* **3**: 362-372.
- Xiao, X., Li, J., Samulski, J.** 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**: 2224-2232.
- Zarnitsyn, VG., Prausnitz, MR.** 2004. Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection. *Ultrasound Med Biol* **30**: 527-538.
- Zhou, X., Nicholas, M.** 1998. In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. *J Virol* **72**: 3241-3247.
- Zhu, W., Thomas, CE., Sparling, PF.** 2004. DNA Immunization of mice with a plasmid encoding Neisseria gonorrhoea PorB protein by intramuscular injection and epidermal particle bombardment. *Vaccine* **22**: 661-670.

Recibido el 17 de agosto de 2004

Aceptado para su publicación el 25 de octubre de 2006