

1. INTRODUCCIÓN

Durante el último siglo se han observado dos importantes acontecimientos en la medicina: el primero de ellos consiste en una disminución de los índices de morbi-mortalidad de las enfermedades infecto-contagiosas y los padecimientos quirúrgicos a causa de la aparición de mejores antibióticos, el mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias, un mejor desarrollo tecnológico y del mejoramiento de las técnicas de asepsia. El segundo deriva de una sorprendente transición epidemiológica de la pirámide de población que ha ocasionado un incremento en el número de individuos pertenecientes a la tercera edad. La peculiaridad de estos acontecimientos ha provocado un significativo incremento en la prevalencia de los padecimientos genéticos, neoplásicos y crónico-degenerativos³⁵.

A pesar del incuestionable impacto sanitario y repercusiones económicas de las enfermedades genéticas, degenerativas y neoplásicas, su tratamiento es inadecuado y preponderantemente sintomático, por lo que su evolución es generalmente progresiva y el pronóstico, en un gran número de ellas, es irremisiblemente fatal. Desde esta perspectiva, resulta lógico comprender la creciente necesidad de experimentar con nuevos métodos terapéuticos y utilizar innovadoras herramientas tecnológicas que permitan erradicar, o al menos controlar, los devastadores efectos que este grupo de padecimientos ejercen sobre las poblaciones humanas.

1.1 LA TERAPIA GÉNICA: UNA INNOVADORA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

La terapia génica es una innovadora estrategia dirigida a transportar, transferir y expresar genes exógenos dentro de células de pacientes, con la finalidad de corregir principalmente defectos genotípicos y modificar sus alteraciones fenotípicas.

En términos generales, la introducción de los genes de interés se puede conseguir ya sea tratando a células extraídas del paciente (*ex-vivo*), que luego son regresadas a éste, o administrando el gen terapéutico directamente en las células de interés (*in-vivo*) Ver la **Figura. 1**

1.2 TERAPIA GÉNICA EX VIVO

Esta estrategia consiste en la obtención de células del paciente procedentes de un tejido u órgano de interés, las que se someten a disgregación, cultivo y preservación en condiciones de cultivo de tejidos. Ahí, las células son ulteriormente transfectadas o transducidas con el "gen terapéutico", utilizando para ello un vector adecuado. Luego, las células genéticamente modificadas son seleccionadas en función de su capacidad para expresar el gen exógeno de manera estable. Enseguida son propagadas y finalmente reimplantadas en el paciente. También es posible utilizar líneas celulares alogénicas en aquellos pacientes en los que por razones clínicas y/o funcionales, el órgano o tejido de interés no puede ser extraído con facilidad u ofrece dificultades para su cultivo o mantenimiento en condiciones *in vitro*.

1.3 TERAPIA GÉNICA IN VIVO

El tratamiento está basado en la administración local o sistemática del gen de interés. Aunque el ADN que constituye dicho gen puede ser administrado de forma directa, lo habitual es recurrir a la ayuda de algún vector que facilite la transferencia, entrada y localización intracelular del mismo. Así mismo, es posible recurrir a vectores que permiten la entrega selectiva del gen en un determinado órgano o tejido tumoral, sin requerir para ello de procedimientos traumáticos o quirúrgicos.

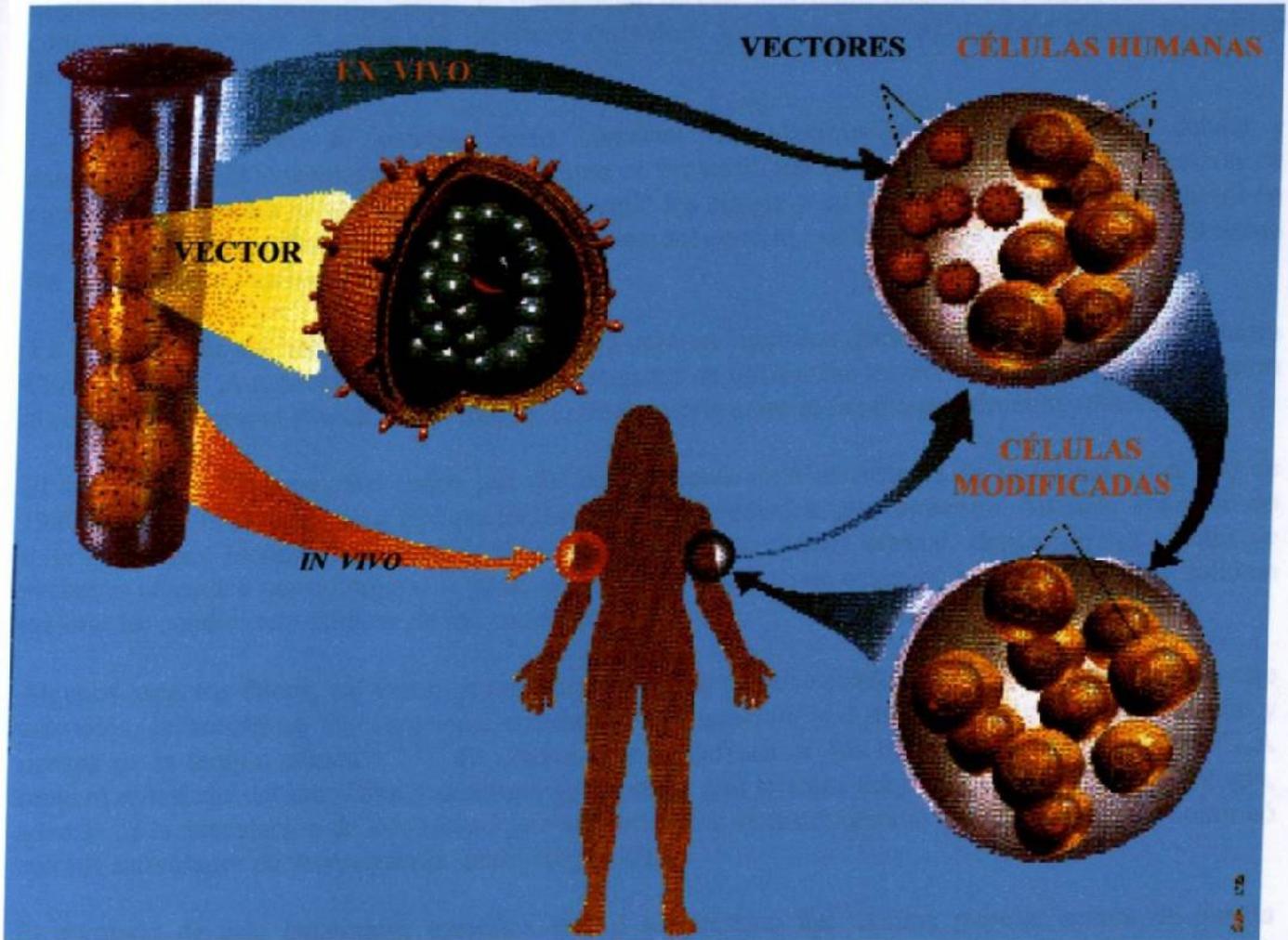


Figura 1. Terapia génica de células somáticas. En la terapia “ex vivo”, se extraen algunas células del tejido afectado y se les inserta el nuevo gen sano, reinsertándolas posteriormente en el tejido del que se extrajeron. Allí se multiplican y expresan la nueva proteína funcional, corrigiendo el defecto. Mientras que en la terapia “in vivo”, para introducir el gen sano es necesario utilizar los llamados vectores, que conducen en la mayoría de los casos a través del torrente sanguíneo, el material genético hasta las células afectadas. [Tomada de Friedmann Theodore (1997): Overcoming the obstacles to gene therapy: Scientific American: June; 80-85]

1.4 LOS PRIMEROS INTENTOS EN EL CAMPO DE LA TERAPIA GÉNICA.

El primer intento de tratar una genopatía en la especie humana se remonta al principio de la década de los 70s, cuando el Dr. Rogers Stanfield inoculó papiloma virus a tres hermanos afectados por una enfermedad autosómica recesiva conocida como argininemia⁶⁸. Los pacientes que sufren de este defecto congénito del metabolismo presentan diplejía espástica, convulsiones, hipotonía, hiperamonemia, irritabilidad y retraso mental profundo. El defecto metabólico deriva de un déficit enzimático en la actividad de la arginasa eritrocitaria y ocasiona un notorio incremento en la concentración de arginina en el plasma y líquido cefalorraquídeo. El fundamento de este innovador método de tratamiento deriva del conocimiento de que el virus del papiloma restablece los niveles de arginasa en células en cultivo deficientes en esta enzima⁶⁸.

La aventurada acción de inocular seres humanos con vectores virales, desencadenó debate y controversia en la comunidad científica. Como el proyecto fue realizado antes de la constitución de comités de bioética a nivel institucional, no se violó ley alguna y no se efectuaron acciones punitivas en contra del Dr. Rogers, ni del grupo de médicos alemanes que lo asistieron, a pesar de que el tratamiento fue infructuoso en varios intentos.

La benevolencia del hecho y la indulgencia de la opinión científica contemporánea, incitó al Dr. Martin Cline de la UCLA a intentar ser el primer investigador en utilizar las técnicas de DNA recombinante en el campo de la terapia génica. Sin embargo, el final de esta historia fue diametralmente opuesto.^{63, 73}

El Dr. Cline se desempeñaba como jefe del departamento de Hematología de la UCLA en el año de 1980, cuando intentó curar a dos pacientes Europeos afectados por talasemia. Su idea consistió en insertar un gen recombinante que codifica para una hemoglobina normal, dentro de las células de pacientes afectados por talasemia. A pesar de que el tratamiento no ocasionó efectos deletéreos, falló en mejorar las condiciones clínicas de los pacientes.

Algunos aspectos éticos, así como procedimientos de la práctica clínica, fueron violados durante este protocolo, levantándose un imponente torrente de comentarios y discusión pública sobre los usos y riesgos de la terapia génica^{63,74,75}. El comité para la defensa de los derechos humanos de la UCLA censuró el trabajo del Dr. Cline y ocasionó su renuncia a la jefatura del departamento de Hematología, además de la cancelación de dos subsidios a sus proyectos de investigación⁷². A pesar de esto, continuó con sus actividades de investigación dentro de la UCLA.

El corolario de este lamentable episodio, fue el surgimiento del axioma popular acerca de que la utilización de DNA recombinante en los seres humanos, debe ser controlada a través de un marco jurídico y/o Comités de Bioética y Bioseguridad que regulen su aplicación.

1.5 EL SURGIMIENTO DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL MANEJO DEL DNA RECOMBINANTE

En 1973 se efectuó una reunión científica en Asilomar, California, para discutir los riesgos inherentes a la utilización de DNA recombinante. El consenso de los participantes fue el mismo que el del axioma popular "es necesario vigilar y reglamentar los trabajos existentes en el campo de la tecnología del DNA recombinante"⁷¹.

En 1974 el NIH conjuntó a un Comité Consultor sobre el DNA Recombinante [Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)] y lo comisionó para formular una serie de leyes dirigidas a regular las investigaciones en ese nuevo campo. El resultado de ello, fue la publicación de una guía de normas y procedimientos para el uso de DNA Recombinante⁷¹.

El establecimiento de este marco normativo permitió institucionalizar los protocolos sobre terapia génica y diseñar nuevas técnicas de Biología Molecular. Asimismo, el desarrollo de diferentes estrategias con el uso de DNA recombinante se ha traducido en importantes avances en el campo de vectores virales y de genes suicidas, proporcionando a los profesionales de la biomedicina, importantes conocimientos que permiten utilizar estas singulares herramientas biológicas con fines terapéuticos.

1.6 REQUISITOS PARA INICIAR UN PROGRAMA DE TERAPIA GENICA

Cualquier prospecto de protocolo de terapia génica, deberá de llenar ciertos requisitos que garanticen su viabilidad, así como un beneficio incuestionable para el paciente. Entre las destrezas, herramientas y justificaciones que se tienen que cumplir, se encuentran las siguientes:

1. Es necesario contar con el gen normal, conocer su estructura y entender su regulación.
2. Es necesario contar con un método eficiente para introducir el gen terapéutico dentro de las células blanco. La versión defectuosa del gen (usualmente disfuncional) permanece inalterada en su locus correspondiente.
3. Es necesario contar con un método eficiente para construir y diseñar vectores virales (o no virales) que puedan transportar los genes terapéuticos a las células blanco (ncoplásticas), dentro del tejido u órgano afectado en el cual el gen normalmente funciona.
4. Es necesario contar con un método eficiente para introducir el vector -portador de un gen terapéutico- dentro de las células eucarióticas, y se debe garantizar su propagación en un elevado porcentaje de las células blanco, con la finalidad de que el procedimiento proporcione indudables beneficios terapéuticos.
5. La terapia génica debe de limitar su campo de aplicación a las células somáticas para evitar que los individuos tratados puedan segregar los transgenes a su descendencia. La terapia génica destinada a células germinales presenta innumerables objeciones y restricciones de carácter ético y debe esperar a que tales problemas se resuelvan dentro de las instancias encargadas de su normatividad y bioseguridad.
6. La terapia génica debe garantizar que los beneficios derivados de su aplicación sean considerablemente mayores que los riesgos o perjuicios producidos por su empleo. Por lo que el beneficio terapéutico debe de superar cualquier tipo de riesgo. El prototipo de riesgo es ejemplificado por la inserción al azar del DNA recombinante dentro de un cromosoma humano, lo cual puede ocasionar la activación de un proto-oncogen o la inactivación de un gen supresor de tumores involucrado con la regulación del ciclo de división celular o en la reparación del ADN. Bajo estas condiciones, la inserción mutacional puede desencadenar una cascada de efectos carcinogénicos. Esta es la explicación de por que los protocolos de terapia génica deben de ser aplicados en pacientes graves, o en estado terminal y preferencialmente intentar la cura de procesos neoplásicos o de enfermedades monogénicas de evolución progresiva y pronóstico irremisiblemente fatal.

7. Los protocolos de terapia génica deben de realizarse en células que puedan ser fácilmente aisladas del paciente, manipuladas *in vitro*, modificadas en condiciones de cultivo de tejidos y posteriormente reimplantadas dentro del paciente.

1.7 ESTRATEGIAS PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA

La función del DNA en la transferencia de características genéticas entre organismos procariotes fue demostrada por Avery, MacLeod y McCarty en 1944¹ y 18 años después Szibalska⁷⁹ la demostró en células eucariotas. Luego Wigler⁸⁷ y cols. demostraron que el gen de la timidin cinasa procedente del virus del herpes simple exhibía la capacidad de transformar células de mamífero portadoras de la mutación TK⁻ en células TK⁺, las cuales podían ser identificadas utilizando un medio de selección HAT, llamado así por contener hipoxantina, aminopterina y timidina⁸⁶. Este procedimiento, consistente en introducir -por medios artificiales- DNA de origen exógeno dentro de células eucariotas, es conocido como **transfección**.

Aunque en los experimentos iniciales se demostró que era posible transfectar con ADN total extraído de una célula TK⁺, con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, la técnica se perfeccionó y se hizo posible introducir genes aislados.

Actualmente, existen un sinnúmero de técnicas que permiten introducir genes dentro de las células de mamífero. En términos generales podemos clasificar a éstas dentro de dos grandes categorías: En primer término, aquellas destinadas a lograr una expresión transitoria del gen de interés, y en segundo lugar, aquellas que permiten transformar a las células de una manera estable y prolongada⁵⁴.

En los sistemas de expresión transitoria, grandes cantidades de DNA recombinante entran en contacto con un reducido porcentaje de la población celular, para luego introducirse en el citoplasma de las células huésped. Esto garantiza una mayor eficiencia en la transferencia génica, así como altos niveles de expresión del transgen. Por lo que se obtendrá una mejor producción de la proteína de interés, aunque su tiempo de expresión sea limitado.

En los sistemas de transformación estable, solamente un pequeño porcentaje de las células pueden ser transfectadas o transducidas con DNA recombinante. Como el gen de interés generalmente se inserta dentro de los cromosomas de la célula, ésta continuará permanentemente transformada y transmitirá el DNA recombinante a su descendencia.

Los sistemas de transformación estable deben garantizar que la secuencia de interés se integre dentro de los cromosomas de la célula o que el DNA recombinante tenga la capacidad de duplicarse de manera autónoma y eficiente. De tal forma, que el gen extraño o transgen no se pierda durante los ciclos posteriores de la división celular⁵³.

Algunos vectores (como los adenovirus) están particularmente diseñados para producir una transformación celular transitoria, mientras que otros vectores virales son más apropiados para garantizar una transformación permanente de las células. Un ejemplo de esto último son los retrovirus.

Basado en la utilización de vectores virales, es posible identificar cinco componentes esenciales que conforman un protocolo de terapia génica:

1. Elección de la enfermedad apropiada.
2. Conocimiento de las bases moleculares del defecto involucrado.
3. Clonación de la contraparte funcional del gen causante de la enfermedad.
4. Regulación correcta y suficiente de la expresión del gen de interés y
5. Procedimiento para introducir el gen terapéutico al interior de las células blanco (neoplásicas).

Adicionalmente, es conveniente conocer las características biológicas del vector que se pretende utilizar, la patogénesis de la enfermedad y contar con un modelo animal o de cultivo de tejidos para validar la estrategia terapéutica que se utilizará.

1.8 DEFINICION DE VECTOR

Los vectores son herramientas biológicas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que éste pueda funcionar correctamente¹⁶. Los vectores pueden clasificarse en: vectores virales y vectores no virales. A causa de que los vectores no virales se encuentran al margen de los objetivos de esta tesis, sólo describiremos algunas de las características más importantes de los vectores virales.

1.9 RETROVIRUS COMO VECTORES EN TERAPIA GÉNICA

En el transcurso de los últimos años se ha observado un desarrollo explosivo en el campo del diseño y construcción de vectores virales. Cada diseño tiene como finalidad mejorar las aplicaciones terapéuticas de estrategias precedentes, así como hacer más simple y económica la construcción del vector viral. Los retrovirus presentan la ventaja de ser los vectores biológicos más exhaustivamente estudiados hasta la fecha.

El genoma de los retrovirus está constituido por una sola cadena de RNA, la cual se duplica a través de la formación de una molécula de DNA bicatenario, como un paso intermedio y dependiente de la transcriptasa reversa. El ciclo de vida de los retrovirus depende de una etapa intracelular en la cual el DNA viral de doble cadena se inserta al azar en el genoma de la célula huésped

El genoma retroviral está constituido por tres genes primordiales, *gag*, *env* y *pol*, los cuales son expresados en poliproteínas. Las secuencias *gag* y *env* se relacionan con el empaquetamiento y generación del virión. El gen *gag* codifica para una "poliproteína" que es seccionada en 3 o 4 proteínas destinadas a formar la cubierta interior del virus. La proteasa que cataliza este recorte forma parte de la propia poliproteína en muchas clases de retrovirus; puede ser parte de *gag* o de *pol*, o en algunas ocasiones se encuentra como un marco de lectura independiente⁴⁵. El gen *env* codifica para los componentes de la corteza o revestimiento de la partícula viral. La secuencia de *pol* está vinculada con los procesos de recombinación y síntesis de ácidos nucleicos. El gen *pol* codifica para la enzima transcriptasa reversa, la cual está constituida por dos subunidades, a y b; el gen *pol* codifica para la subunidad b, mientras que la subunidad a es un fragmento formado a partir de la proteólisis de la subunidad b. El producto del gen *pol* es también una poliproteína que dará lugar a la transcriptasa reversa y a una integrasa necesaria para la inserción del DNA viral dentro de los cromosomas de la célula huésped⁵⁵. Ver la Figura 2.

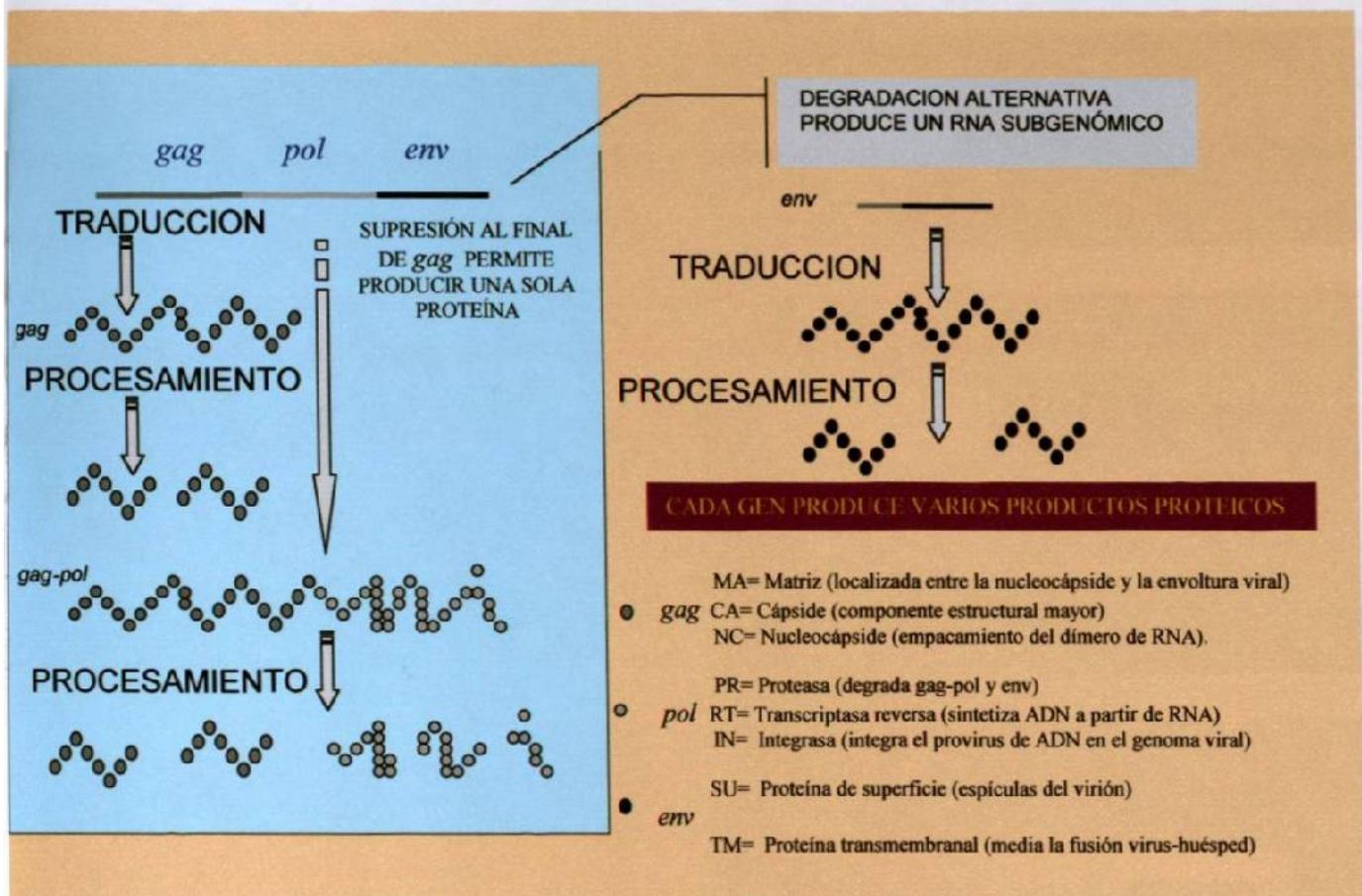


Figura 2. Genoma retroviral. Los genes del retrovirus son expresados como poliproteínas que luego son procesadas en productos proteicos individuales. [Modificado de Lewin Benjamin (2000): Genes VII. Oxford Univ. Press. 488]

La enzima transcriptasa reversa cataliza tres diferentes reacciones: primero, la síntesis de DNA a partir de RNA; segundo, la degradación de RNA a través de su actividad de RNAsa, y tercero, la síntesis de DNA a partir de DNA. La enzima requiere de un cebador para iniciar la síntesis de DNA. El cebador es una molécula de tRNA incluido dentro de la partícula viral y obtenido durante una infección previa. La molécula de DNA (de cadena simple) transcrita a partir del genoma de RNA original, es más larga que la matriz de RNA que le dió origen, ya que la enzima transcriptasa reversa realiza un intercambio de transcritos al copiar la secuencia 3' del RNA en el extremo 5' del DNA y copiar la secuencia 5' del RNA en el extremo 3' del DNA. La particularidad de este fenómeno dará origen a los característicos LTRs (Long Terminal Repeats) en ambos extremos del DNA. Las secuencias LTRs son indispensables para la integración del genoma viral. El DNA lineal bicatenario es ulteriormente insertado por medio de la integrasa en los cromosomas de la célula huésped. La transcripción del DNA integrado a partir de un promotor en el LTR izquierdo generará las futuras copias de la secuencia de RNA del genoma retroviral³⁸. Ver la **Figura. 3**

Los retrovirus han desarrollado el método biológico más eficiente para introducir genes foráneos al interior de las células animales, siendo por ello ideales para derivar vectores para terapia génica. Los virus han desarrollado refinados sistemas de infección celular que inician con la unión de la partícula viral a receptores específicos de membrana celular, continúan con la liberación y/o expresión de su genoma dentro del citosol, y culminan con la inserción de su genoma (en el caso de retrovirus) dentro de los cromosomas de la célula huésped.

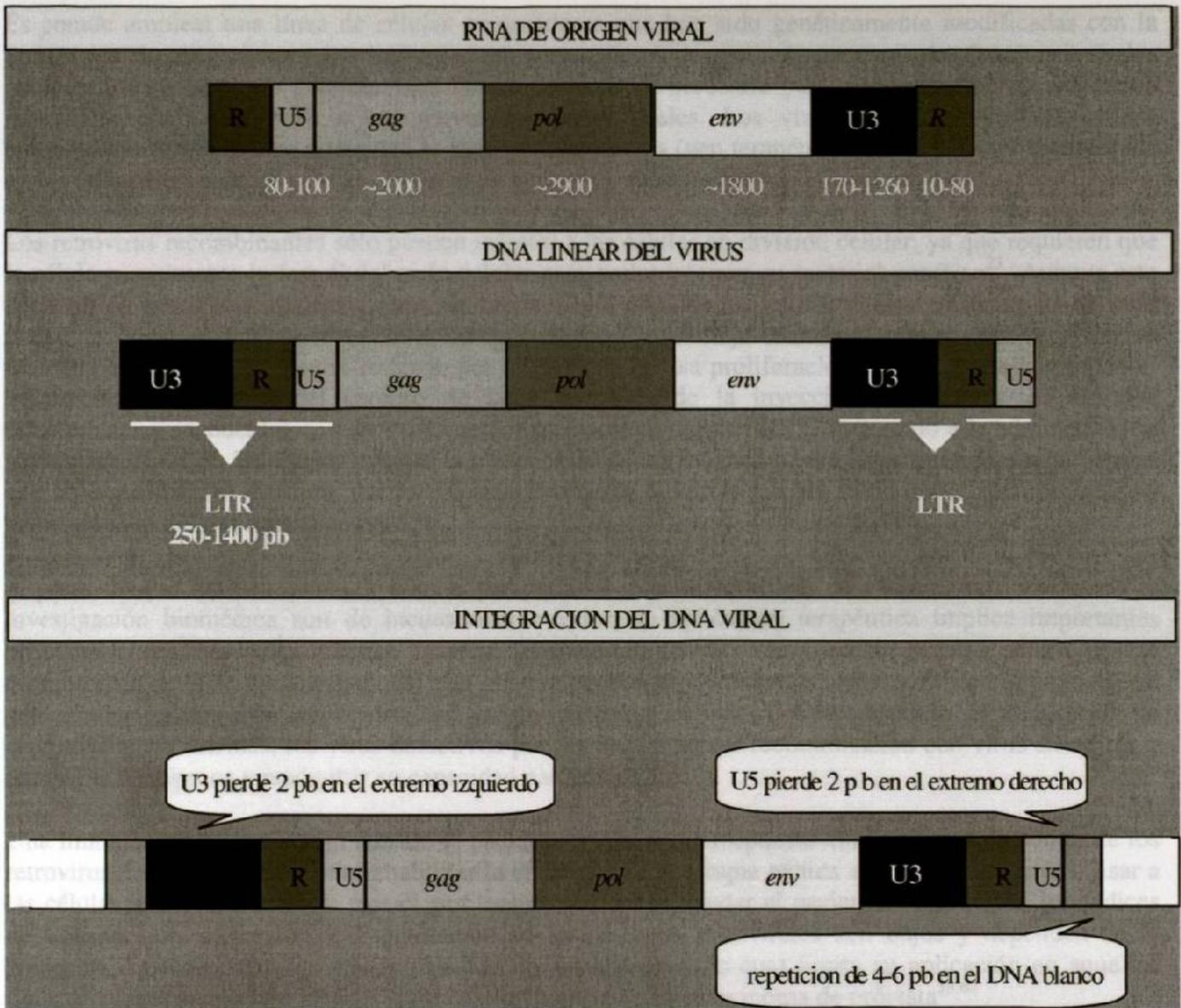


Figura 3. Mecanismo de integración de retrovirus. El RNA del retrovirus termina en repeticiones de 10 a 80 nucleótidos (R). Mientras que el DNA lineal termina en LTR_s y el provirus termina en LTR_s que han sido recortados en dos pares de bases. [Modificado de Lewin Benjamin (2000): Genes VII. Oxford University Press. 489.]

El procedimiento general para la construcción de un vector retroviral recombinante consiste en: eliminar y sustituir los genes *gag*, *pol* y *env* para producir un vector viral defectivo en su replicación, el cual requiere de una complementación de sus funciones virales *en trans* (proporcionados por un genoma viral diferente al del vector en cuestión). Las secuencias virales que necesariamente deben conservarse dentro del vector son: los extremos LTRs indispensables para la integración, los sitios adyacentes para enlace con el cebador, y las señales para empacamiento³⁸.

Es común emplear una línea de células empacadoras que han sido genéticamente modificadas con la **integración de un genoma retroviral defectivo pero capaces de producir, en trans, las funciones virales faltantes**²⁹. Este segundo genoma viral carece de la señal necesaria para el empacamiento, quedando inhabilitado para integrarse a las nuevas partículas virales. Los virus secretados por las células empacadoras normalmente contienen la secuencia de interés (gen terapéutico), lista para ser incorporada en los cromosomas de las células del paciente con un elevado margen de eficiencia.

Los retrovirus recombinantes sólo pueden infectar a las células en división celular, ya que requieren que la célula experimente la fase S del ciclo celular para poder integrar su material genético²⁵. Aunque este hecho es en apariencia una desventaja, ya que la mayor parte de los tejidos vitales presentan un elevado índice mitótico, el fenómeno puede transfigurarse en una ventaja cuando el tumor canceroso que se pretende erradicar se encuentra rodeado por tejidos con escasa proliferación celular. Por ejemplo, en el tratamiento de gliomas del cerebro de ratas, a través de la inyección de fibroblastos murinos establemente transducidos con un vector retroviral portador del gen HSV/tk, aunado a la administración simultánea de GCV. La técnica explota la incapacidad de los retrovirus para transferir genes a las células que no experimentan división, por lo que selectivamente el vector actuará sobre las células tumorales y respetará a las células normales del SNC¹³.

A pesar de que los beneficios, y nuevas perspectivas inherentes al uso de vectores retrovirales en la investigación biomédica son de incuestionable valor, su aplicación terapéutica implica importantes problemas. Algunos virus pueden insertar su material genético de manera azarosa dentro de los cromosomas de la célula huésped. De esta manera pueden producir mutaciones por inserción e inactivar genes relacionados con el control de la proliferación celular, desencadenando el fenómeno de carcinogénesis. Además, los virus defectivos pueden experimentar recombinación con virus silvestres o retrovirus endógenos y readquirir su capacidad patogénica.^{50,51}

Una limitación adicional surge cuando el paciente produce una respuesta inmunológica en contra de los retrovirus. Esta respuesta puede inhabilitar la eficiencia de la terapia génica al destruir al vector o lisar a las células infectadas antes de que el gen terapéutico pueda ayudar al paciente. Finalmente, los índices de transducción, expresión y diseminación de los vectores retrovirales son bajos y dependen de la presencia de una población celular rápidamente proliferativa, lo cual limita su aplicación en aquellos tipos de cáncer con escasa proliferación celular, como el adenocarcinoma de próstata^{58,62}.

1.10 ADENOVIRUS COMO VECTORES RECOMBINANTES EN PROTOCOLOS DE TERAPIA GÉNICA.

Los vectores adenovirales, en comparación con los retrovirus, presentan un conjunto de ventajas e inconvenientes. Las ventajas derivan de la ubicuidad y bioseguridad de los adenovirus humanos. Las formas silvestres ocasionan un cuadro moderado de faringitis en personas sanas. Los virus tienen especial afinidad por las células epiteliales, a las que se unen por medio de receptores de membrana específicos. Además, la expresión de su material genético no depende de la división celular de la célula huésped. Finalmente, los adenovirus infectan con facilidad a las células humanas, produciendo niveles elevados de la proteína terapéutica durante las etapas iniciales de la infección.

Después de la internalización de las partículas virales, su ADN es exportado hacia el núcleo, pero no se inserta en los cromosomas^{30,31}. Consecuentemente, existe muy poco riesgo de secuelas derivadas de la infección con adenovirus. Esta observación elimina la posibilidad de segregación mendeliana en células germinales y el riesgo de mutagénesis insercional,^{22,91} características ambas indeseables de los retrovirus.

Adenoviridae es una familia de virus patógenos de vertebrados. Sus viriones contienen ADN bicatenario, son de simetría cúbica, carecen de envoltura y presentan espículas (pentones). Los adenovirus son icosaedros de 65 a 80 nanómetros de diámetro, su genoma tiene una longitud de 36,000 nucleótidos y contiene 13% de ADN y 87% de proteínas. Fueron aislados por primera vez en 1953 por Rowe⁶⁹, a partir de las amígdalas o tejido adenoidal proveniente de niños con infecciones faríngeas. Se clasifican en 6 subgéneros (A,B,C,D,E y F) y se han descrito más de 42 serotipos con capacidad de provocar infecciones en el hombre.

Los tipos 2 (Ad2) y 5 (Ad5) han sido extensamente estudiados, y son por lo tanto ampliamente utilizados en el diseño de vectores virales para terapia génica^{27,37}. Aunque, existen algunos reportes que describen su capacidad de generar tumores en animales, no se ha descrito su asociación con tumores en los seres humanos.

La infección por Ad5 se traduce en una infección aguda de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, ojos, glándulas y nódulos linfáticos, siendo el cuadro clínico leve y muy similar al del resfriado común. Como la exposición a adenovirus se encuentra ampliamente difundida entre la población, la mayor parte de la población de adultos son seropositivos para este tipo de virus.

En su forma natural se les encuentra en el núcleo de las células infectadas, como estructuras circulares normalmente cerradas, a causa de la interacción con proteínas covalentemente unidas a cada uno de los extremos 5' del genoma viral. El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular que permiten clonar DNA circular de origen viral, facilita enormemente el poder manipular esos genomas, para lograr producir vectores virales defectivos en su duplicación⁵⁶.

Los mecanismos de expresión génica se realizan en dos importantes etapas, usualmente conocidas como fase temprana y fase tardía (Graham, 1991, Horwitz, 1991). Desde un punto de vista muy general se puede afirmar que las proteínas formadas durante la fase temprana son de naturaleza regulatoria, mientras que las que se expresan tardíamente están relacionadas con los componentes estructurales del virión.

Se han identificado seis regiones de expresión temprana (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4), aunque otras regiones diferentes a éstas también han sido asociadas con expresión inmediata después de la infección (L1, IVa2 y IX). Las regiones E1A y E1B son indispensables para la duplicación del virus y se han vinculado con la capacidad oncogénica de los adenovirus *in vitro*. La región E2A codifica para una proteína que se une al DNA y E2B codifica para una DNA polimerasa y para la proteína que se une a los extremos 5' del genoma viral. Aunque E3 no es necesaria para la duplicación viral *in vitro*, sí se encuentra asociada con el mecanismo que permite al virus evadir los sistemas de defensa inmunológica del huésped. Finalmente, la proteína E4 es responsable del ensamblaje de partículas virales.

La producción de vectores adenovirales con incompetencia para duplicarse es un elemento clave de su bioseguridad y se complementa con dos aspectos. El primero, consiste en la condición de depender de la producción de proteínas regulatorias en "trans" (fuera del genoma viral) y el segundo, se relaciona con la incapacidad de la cápside para contener (empacar) más del 105% del genoma total del virión. Para resolver la primera condición, es necesario contar con una línea celular "ayudadora", correspondiendo en este caso a células transformadas de riñón fetal de la línea 293, las cuales han sido transfectadas con *secuencias genómicas de origen adenoviral derivadas del extremo izquierdo (0-11 unidades) del mapa génico* y que contienen la región E1A del genoma viral, de tal forma que complementan en trans la propagación del Adv-recombinante (Graham, 1997)²⁶. Esta línea celular permite producir virus incompetentes para la duplicación -defectivos en E1-.

El desarrollo de una estrategia de producción de vectores virales se basa en el conocimiento de que el DNA viral se torna circular dentro de las células infectadas, por lo que este fenómeno puede ser explotado para producir genomas-AdV circulares infecciosos, que pueden ser posteriormente propagados como plásmidos bacterianos. El uso de plásmidos durante el proceso de producción y propagación de Adv-recombinantes es hoy ampliamente difundido debido a que se disminuyen *grandemente las posibilidades de regeneración de adenovirus competentes en su replicación*, debido a que el genoma plasmídico es usualmente 3 o 7 kb más grande que el del genoma viral, y no podrá ser empacado dentro de la cápside viral. Por lo tanto, es posible construir genomas virales auxiliares con insertos de DNA de relleno. Estas construcciones con genoma redundante, exceden la capacidad máxima de empacamiento de la cápside viral e impiden el proceso de ensamblaje de los viriones (Bett, 1993-94)^{4,5}, pero pueden ser utilizadas en procesos de co-transfección con plásmidos portadores del gen terapéutico, para así lograr la producción de un vector terapéutico a través de un mecanismo de recombinación.

Debido a que los viriones pueden empacar hasta un 105% de la longitud del genoma de un adenovirus silvestre, después de producir una delección de 2.9 kb dentro de la región E1, es posible obtener construcciones de vectores deficientes en su duplicación con insertos de hasta 4.7-4.9 kb. El genoma adenoviral es demasiado largo para ser convenientemente manipulado, sin correr el riesgo de seccionar la molécula de ADN durante el procedimiento de clonación o inserción del gen terapéutico de interés. Para salvar este inconveniente, el gen de interés es insertado dentro del extremo izquierdo del genoma viral, usualmente por medio de delecciones compensatorias en la región E1. La región E1 no es necesaria para la duplicación viral dentro de las células 293, ya que estas expresan el 11% del extremo izquierdo del genoma-Adv5. Para garantizar la viabilidad de los viriones, la delección no debe de incluir las secuencias de repetición terminal invertidas ni la señal de empacamiento. Como paso final, la construcción es posteriormente ligada a un plásmido recombinante²⁷.

El genoma redundante -virus auxiliar- y el genoma plasmídico portador del gen de interés son co-transfectados en las células 293. El tamaño del gen de interés más la longitud del genoma viral defectivo no deben de exceder las limitaciones de tamaño para el empaquetamiento. De tal forma, que el virus será producido solamente cuando ocurran fenómenos de recombinación genética entre los dos plásmidos, y el gen de interés reemplace al ADN de relleno, produciéndose un ADN recombinante lo suficientemente largo para ser empacado dentro de la cápside del virión^{28,29}. Ver la **Figura 4**.

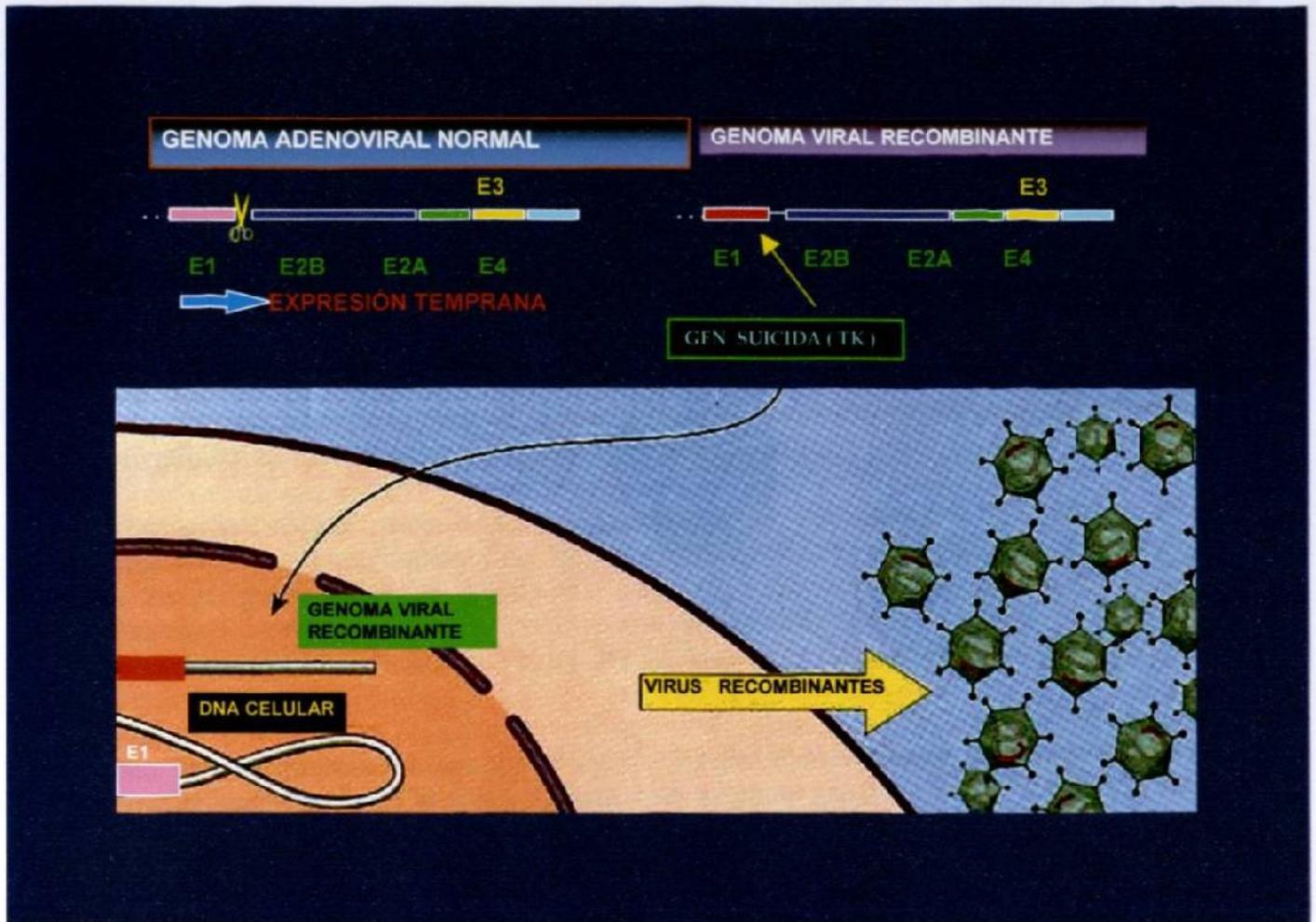


Figura 4. Fabricación de adenovirus recombinantes. Muestra como el transgen es insertado dentro del genoma adenoviral con la región E1 amputada. Sin la región E1 el virus se torna deficiente en su duplicación. Con la finalidad de producir grandes cantidades de virus recombinantes para fines terapéuticos, se pueden utilizar células empacadoras que aportan las proteínas codificadas en la región E1. [Modificado de Douglas Joanne T y Curiel David T (1977): Adenoviruses as vectors for gene therapy: Science and Medicine: March/April, 44-53.]

1.11 VENTAJAS DE LOS VECTORES ADENOVIRALES EN TERAPIA GÉNICA

La bioseguridad de adenovirus en terapia génica ha sido corroborada en el tratamiento del cáncer de próstata, hígado, ovario, vejiga y pulmón. Así como en el tratamiento de algunas enfermedades monogénicas como la fibrosis quística, en la falta de la enzima ornitín-transcarbamilasa y en la deficiencia del factor IX^{8,77,90}. Recientemente, se ha demostrado la eficacia terapéutica y la seguridad de adenovirus transportadores del gen (supresor del crecimiento tumoral) **p53** en el tratamiento del cáncer pulmonar en ratones desnudos atímicos⁶⁴.

Los adenovirus son estables en el torrente sanguíneo. Esta observación permite su inoculación sistémica (endovenosa) en protocolos de terapia génica. Sin embargo, los adenovirus son inmunogénicos y los pacientes desarrollan una respuesta inmune en contra del vector, limitando de esta manera la expresión del gen terapéutico e imposibilitando administraciones subsecuentes del vector. Como el DNA viral eventualmente desaparece, el tratamiento de enfermedades crónicas y de tumores de evolución lenta requiere de la inoculación repetida del vector, lo que constituye una desventaja de los vectores adenovirales.

Esta situación desventajosa, puede en algunas condiciones transformarse en una prerrogativa, por ejemplo, cuando es necesario expresar temporalmente una proteína para inducir una respuesta inmune o una respuesta suicida en contra de algunos tipos de cáncer. En efecto, la administración de un solo ciclo de tratamiento a base de la inyección intratumoral de un vector adenoviral portador del gen HSV/tk, junto con la administración simultánea de ganciclovir, se ha traducido en una importante remisión del crecimiento tumoral en pacientes con carcinoma de próstata focalizado³⁴.

Adicionalmente, los vectores adenovirales pueden suprimir al tumor a través de un efecto oncolítico directo, ocasionado por la replicación viral. Este efecto incrementa la respuesta inmune del huésped en contra de los antígenos tumorales. Desde esta perspectiva, los adenovirus pueden ser útiles como vacunas tumorales o para expresar genes relacionados con los antígenos de superficie de Hepatitis B, ya que ellos pueden duplicarse en células Vero y WI-38, las cuales están acreditadas para producción de vacunas⁹.

En resumen, las ventajas relacionadas con el uso de vectores adenovirales se fundamentan en el hecho de que son relativamente fáciles de estudiar, pueden ser alterados genéticamente, y tienen una tendencia natural de adherirse a tipos específicos de células y de transferir su ADN a las mismas. Algunas de las ventajas más importantes son enlistadas a continuación:

- a. Los vectores adenovirales pueden ser preparados, purificados y concentrados fácilmente y pueden alojar genes de gran tamaño.
- b. Admiten hasta casi 36 Kb. de ADN foráneo (ya que se puede eliminar casi todo el material génico involucrado en la replicación viral).
- c. En su producción se obtienen títulos altos de adenovirus recombinantes purificados.
- d. Aunque introducen genes en el núcleo, no ocasionan mutagénesis insercional.
- e. Son fácilmente manipulables *in vitro*.
- f. Son eficientes para transferir genes suicidas *in vivo*.
- g. Infectan células que no están en división celular.
- h. La infección causa síntomas benignos.
- i. La infección presenta ubicuidad tisular.

1.12 PRINCIPALES INCONVENIENTES DE LOS VECTORES ADENOVIRALES.

La presente generación de vectores adenovirales presenta cuatro importantes limitaciones: *i).* primero, los adenovirus son inmunogénicos, por lo que los seres humanos son portadores de anticuerpos preformados en contra del vector. Durante el inicio del tratamiento pueden expresar cantidades importantes de la proteína deseada, pero la inmunidad humoral del huésped rápidamente suprime la expresión del gen terapéutico.

ii). Segundo, carecen de especificidad para células blanco, lo cual hace imposible transportar genes (por inyección endovenosa) a tejidos específicos con propósitos terapéuticos. *iii).* Tercero, son muy pequeños y no pueden acomodar secuencias largas dentro de su genoma.

iv). Finalmente, aunque se ha reportado que los adenovirus no provocan efectos adversos¹² Postlethwaite¹⁷ en 1973 y Duncan¹⁷ en 1978, refieren alteraciones hepáticas en ratones que recibieron una inyección intravenosa de adenovirus humanos tipo 5.

1.13 LA TERAPIA GÉNICA DE LOS TRASTORNOS GENÉTICOS.

Los avances en terapia génica de las enfermedades hereditarias en su conjunto, son considerados inadecuados. Además, los experimentos en este campo están sometidos a estrictas regulaciones prácticas y a severas medidas de bioseguridad y ética, por lo que se han visto restringidos al estudio y tratamiento de trastornos mendelianos graves o de pronóstico fatal. Por otro lado, las investigaciones están circunscritas a las células somáticas, para garantizar que las modificaciones genéticas no puedan ser transmitidas a la progenie.

Históricamente, las enfermedades monogénicas han sido tratadas suprimiendo los efectos biológicos o funcionales de las mutaciones génicas, pero excepcionalmente es posible corregir el defecto molecular que las origina. Desafortunadamente, la manipulación o intervenciones no genéticas (sintomáticas) son usualmente paliativas e insólitamente curativas. Ante este desalentador panorama, las diferentes estrategias de terapia génica ofrecen una razonable oportunidad para recuperar la salud en aquellos individuos que sufren los efectos de alguna enfermedad monogénica^{40,41,49}.

Entre las enfermedades genéticas que han sido estudiadas con este propósito se encuentran el síndrome de inmunodeficiencia secundaria a deficiencia de adenosin deaminasa (ADA). Los pacientes con deficiencia de ADA mueren en etapas tempranas de la vida a causa de infecciones intercurrentes, ya que sus linfocitos T y B no se desarrollan correctamente.

La carencia de ADA ocasiona una significativa elevación en los niveles de dATP, el incremento del cual provoca por retroinhibición una deficiencia general en los niveles de otros dNTPs, lo cual provoca citotoxicidad en los linfocitos T, ya que la deoxiadenosina es particularmente tóxica para las células T pero no para los linfocitos B⁵⁷. Aunque existe tratamiento sintomático en forma de administración de antibióticos, inmunoglobulinas y trasplante de médula ósea, los pacientes con deficiencia de ADA no sobreviven y permanecen confinados a una "burbuja estéril".

Precisamente, el primer intento exitoso de terapia génica fue iniciado en 1990 en una niña de 4 años de edad afectada con deficiencia de ADA. Las células de la paciente fueron sometidas a leucoféresis y las células mononucleares fueron aisladas y cultivadas bajo condiciones que estimulaban la activación y el crecimiento de los linfocitos T. Posteriormente, los linfocitos fueron incubados en presencia de un vector retroviral recombinante portador del gen normal de la ADA, así como de un marcador de selección (gen de resistencia a la neomicina). Finalmente, los linfocitos modificados fueron introducidos al torrente circulatorio de la paciente. Un segundo paciente fue sometido al mismo tratamiento en 1991. Los resultados obtenidos en ambos pacientes demostraron una notoria mejoría de sus condiciones clínicas y en sus funciones inmunológicas (Culver & Anderson, 1991)¹⁴.

Recientemente, se han efectuado protocolos de terapia génica en pacientes con fibrosis quística⁸⁵ y deficiencia del factor IX. Las estrategias de terapia génica dirigidas a introducir una versión funcional del gen que debería producir un producto denominado regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística o CFTR, han demostrado que la terapia génica de estas enfermedades es efectiva, segura y presenta pocos efectos colaterales (Zielenski, 1995)⁹².

1.14 LA TERAPIA GÉNICA SUICIDA

El tratamiento de un gran número de procesos neoplásicos se fundamenta en el uso de agentes quimioterápicos con una elevada capacidad para aniquilar a las células cancerosas. Sin embargo, la utilidad de tales esquemas terapéuticos se ve limitada por su carencia de selectividad y su consecuente toxicidad celular sobre tejidos normales. Un prometedor abordaje para incrementar la selectividad tisular de los agentes antineoplásicos, consiste en el uso de "genes suicidas", los cuales son genes que originan la conversión de un droga inactiva ("prodroga") en un agente quimioterápico farmacológicamente activo. La estrategia consiste en asegurar la presencia y expresión de genes suicidas en tantas células cancerosas como sea posible, mientras se limita su expresión en las células de los tejidos normales^{83, 95}.

Con el descubrimiento de genes que selectivamente se expresan en las células de tejidos específicos, se ha desarrollado una nueva avenida de investigación que permitirá en corto tiempo, etiquetar genes terapéuticos para que se transcriban de manera selectiva dentro del núcleo de las células de ciertos tejidos. Estos genes de expresión tisular-específica, han sido identificados recientemente, y representan nuevos oncogenes, receptores de superficie celular, genes supresores de tumor, así como promotores de enzimas, antígenos y hormonas, entre otros³⁶.

Recientemente, Braidon (1998)⁶ reportó un innovador abordaje para el tratamiento del cáncer de tiroides. La estrategia consiste en la construcción de un vector retroviral portador del gen HSV/tk, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor de la tiroglobulina (TG). Sus resultados demuestran que este vector recombinante etiquetado con el promotor-TG, confiere sensibilidad al GCV a todas las células tiroideas que expresan TG. Este modelo de terapia génica suicida, puede ser aplicable en el tratamiento selectivo de carcinomas de tiroides que expresan TG.

Desde esta misma perspectiva, se ha caracterizado una secuencia promotora altamente eficiente para el gen del antígeno prostático seroespecífico (APSE). La expresión de este promotor es dependiente de andrógenos y exclusiva del tejido prostático. En breve tiempo se iniciarán protocolos de investigación en fase I consistentes en ligar esta secuencia promotora con diferentes genes suicidas (HSV-tk, citosin-deaminasa etc.), en un intento de lograr un expresión selectiva y limitada al microambiente de la próstata⁸.

Existe también la posibilidad de enlazar estas secuencias rotulantes con genes que codifican para proteínas citotóxicas, como el de la toxina diftérica y el del factor de necrosis tumoral, cuya capacidad de matar células es sumamente efectiva, lo cual limita su administración de forma sistémica. La expresión selectiva de este grupo de genes, puede transformarlos en valiosos instrumentos para iniciar nuevas estrategias de terapia génica suicida.

Alternativamente, Herman y Aguilar han sostenido que se pueden administrar genes suicidas no etiquetados, de manera directa dentro del parénquima prostático. La inyección directa sin la ayuda de un promotor de selectividad como el del APSE, puede en teoría garantizar altos niveles de expresión dentro de tumores de próstata. A este respecto, estos investigadores han reportado disminución de los niveles del APSE, así como ausencia de toxicidad sistémica después de la inoculación intratumoral directa de un vector adenoviral portador del gen timidín-quinasa del virus Herpes Simple (HSV-tk)³⁴, seguida por la administración de ganciclovir, cuyo mecanismo de acción se ilustra en la figura 5.

Por otro lado, en el Laboratorio de Vectores Virales del Baylor College of Medicine de Houston Texas y en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L se ha utilizado el virus Herpes Simple portador del gen de la timidín quinasa (*HSV-tk*), -el cual codifica para una enzima destinada a activar por fosforilación un agente farmacológico conocido como Ganciclovir (*GCV*) - para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma de próstata^{18, 69}. Puesto que las células de mamífero no poseen la capacidad de monofosforilar al GCV, la citotoxicidad de este fármaco quedará vinculada y dependiente de una exitosa introducción del vector adenoviral y de la subsecuente expresión del gen HSV-tk que permite activar al GCV.

Las células del paciente que no se encuentran en proliferación celular activa pueden expresar el gen HSV-tk y por añadidura fosforilar al GCV. Sin embargo, este fenómeno no representa peligro para el paciente, ya que las células que no experimentan mitosis no sintetizan DNA y por ende no utilizan el GCV fosforilado. Por lo tanto, el riesgo es considerablemente menor al derivado de la utilización de otros quimioterápicos con elevada capacidad citotóxica y usualmente utilizados dentro de los esquemas terapéuticos de la mayoría de los Departamentos de Oncología.

Este novedoso enfoque terapéutico está particularmente diseñado para ser aplicado en pacientes con procesos neoplásicos caracterizados por un alto grado de malignidad, secundaria a su elevada proliferación celular y capacidad de formar metástasis. Una segunda condición para seleccionar al paciente sometido a tratamiento, es que el tumor se encuentre adyacente a tejidos u órganos constituidos por células con escasa proliferación celular. Ver la **Figura 5**.

1.13 TERAPIA GÉNICA PREVENTIVA (Ganciclovir)

Este singular tratamiento consiste en utilizar genes salvados desde los herpesvirus preventivos de los trastornos neoplásicos. La terapia génica preventiva consiste en introducir genes en la etiología causal de los tumores y permite introducir genes capaces de inducir la muerte o en individuos con predisposición genética al cáncer (portadores de oncogenes) o en aquellos con lesiones pre-neoplásicas (leucoplasias, papilomas), con la esperanza de interrumpir las posibilidades de desarrollo de tumores de cualquier tipo de cáncer que produce.

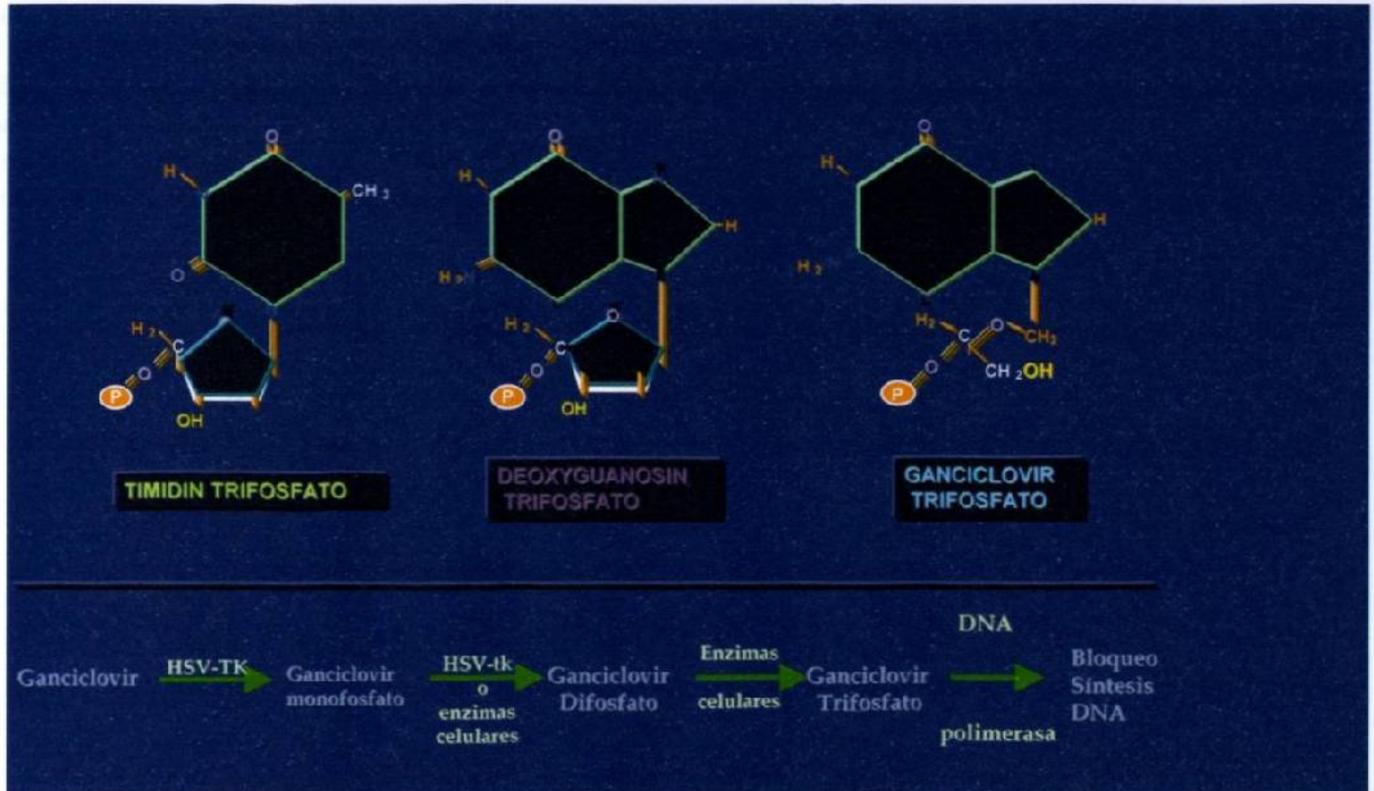


Figura 5. Mecanismo de acción del ganciclovir. El ganciclovir, cuya forma activa es el GCV trifosfato, no es fosforilado inicialmente a su forma monofosfatada por las quinasas celulares. Este paso requiere de la participación de la enzima timidin quinasa de origen viral (*HSV-tk*). Posteriormente, el GCV-monofosfato es fosforilado hasta su forma trifosfatada por las quinasas celulares. La fosforilación de este análogo de nucleósido lo transforma en un intermediario que posteriormente es incorporado en las cadenas de DNA durante el proceso de división celular, bloqueando a la DNA polimerasa y suprimiendo el proceso de duplicación del material genético celular, ocasionando la muerte de la célula afectada.

1.15 TERAPIA GÉNICA PROFILÁCTICA (Genoprofilaxis)

Esta singular estrategia consiste en utilizar genes suicidas como terapéutica preventiva de los trastornos neoplásicos. La terapia génica preventiva explota la etiología clonal de las neoplasias y permite introducir genes suicidas en individuos sanos o en individuos con predisposición genética al cáncer (portadores de oncogenes), o en pacientes con lesiones pre-malignas (displasias, poliposis), con la esperanza de incrementar las probabilidades de curación de cualquier tipo de cáncer que pudiera desarrollarse posteriormente⁹⁴.

Este abordaje terapéutico, proclama solucionar los inconvenientes de la terapia génica tradicional, al eliminar cualquier dependencia en selectividad tisular y excluyendo la necesidad de transducir de manera simultánea a millones de células cancerosas. Asimismo, ofrece garantizar la transferencia del transgen en tejidos inaccesibles o en metástasis con escasa irrigación vascular. Para salvar estos inconvenientes la genoprofilaxis propone la estrategia que se describe a continuación.

Como la mayoría de las neoplasias se originan a partir una sola célula (monoclonales), la genoprofilaxis estará dirigida a introducir genes suicidas, no en tejidos tumorales sino, en aquellos tejidos normales en los cuales el cáncer pueda surgir en un futuro. Debido a la naturaleza clonal de los procesos cancerosos, cualquier mutación que ocasione cáncer dentro de las células de tejidos que han sido profilácticamente transducidos, deberá transmitirse de manera conjunta con el gen suicida, a toda su descendencia celular, incluyendo a las zonas de metástasis.

El método de profilaxis génica puede ser aplicado principalmente en tejidos no vitales, como el de próstata o de glándula mamaria. La estrategia consiste en transducir el gen suicida a tantas células normales como sea posible, para maximizar la probabilidad de que un tumor que llegase a surgir, lo haga a partir de una de las células que han sido previamente transducidas. Cualquier intento de promover selectividad celular se torna innecesario, ya que la pérdida de tejido normal durante el tratamiento del cáncer será de poca significancia clínica para el paciente.

La terapia génica profiláctica puede utilizarse en tejidos vitales, pero con una táctica diferente. El enfoque consiste en exponer el tejido a múltiples genes suicidas, diseminados y propagados para formar un mosaico celular, en el cual diferentes células están sensibilizadas a diferentes pro-drogas. Bajo estas circunstancias, el tumor que pueda surgir ulteriormente conservará su sensibilidad a la pro-droga respectiva, ya que emanó de una célula transducida. La sensibilidad será sólo compartida con una pequeña fracción de las células normales, permitiendo así que el tejido vital sobreviva a los efectos de la terapia génica suicida. Ver la **Figura 6**.

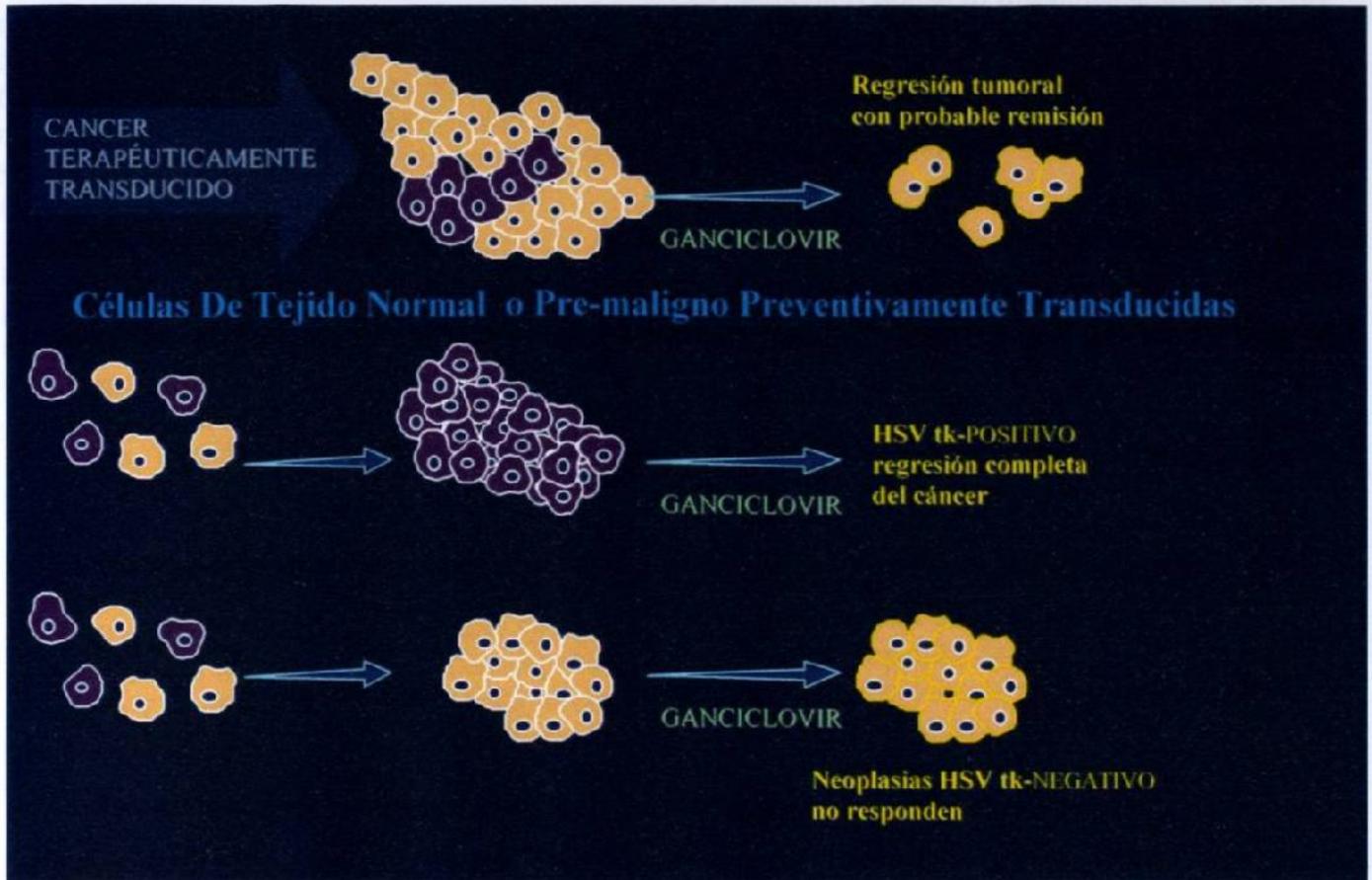


Figura 6. Terapia génica profiláctica. La técnica de genoprofilaxis puede ser la única posibilidad de garantizar que cada célula cancerosa quede expuesta a los efectos de los genes suicidas, demostrando que el cáncer ha surgido de un clon celular que ha sido transducido. [Modificado de Moolten Frederick L. (1997): Suicide genes for cancer therapy. *Science & Medicine* July/August, 16-25.]

2. ANTECEDENTES

Los adenovirus recombinantes de origen humano son ampliamente utilizados en protocolos de terapia génica, tanto en modelos pre-clínicos como en estudios clínicos en fase I. Su explosiva utilización se debe en parte a que los vectores adenovirales de primera generación exhiben una notable y prolongada estabilidad biológica dentro del torrente circulatorio. Esta condición les permite funcionar como excelentes vehículos para transportar genes terapéuticos a varios órganos, diferentes tumores y a diversos tipos de células neoplásicas¹⁶.

A pesar de esta ventaja biológica, existen dos importantes factores que han limitado explotar el potencial de los vectores adenovirales en protocolos de terapia génica. El primer problema es su carencia de especificidad hacia un solo tipo de células huésped. En efecto, los adenovirus pueden infectar un amplio rango de líneas celulares, lo cual hace difícil transportar genes terapéuticos –por vía endovenosa– hacia un determinado grupo de células o hasta un órgano en particular.

Desde una perspectiva oncológica, podemos suponer que los vectores virales portadores de genes suicidas (capaces de activar una pro-droga en un agente citotóxico) pudieran diseminarse desde el sitio de inyección en el tumor, hacia áreas circunvecinas u órganos periféricos sanos y vitales, ocasionando fenómenos de toxicidad no deseada. A pesar de lo anterior, los vectores adenovirales constituyen la mejor opción para el tratamiento de tumores sólidos, debido a la expresión transitoria del gen terapéutico y el supuesto de que estos vectores solamente infectarán el parénquima tumoral y a sus áreas adyacentes^{12, 16, 22}.

Una segunda desventaja observada durante el uso de adenovirus en el tratamiento del cáncer, es el desarrollo de una respuesta inmunológica en contra de las partículas virales dentro del paciente. Bajo tales condiciones, la expresión de los genes terapéuticos es limitada y de carácter transitorio, durando menos de 4 semanas después de la primera inyección. Como el genoma adenoviral eventualmente desaparecerá, en el organismo vivo, el grado de transducción adenoviral de las células blanco puede ser muy bajo, debido a la existencia de anticuerpos preformados en contra del vector o al pronto establecimiento de una respuesta inmunológica en contra de los antígenos de la cápside^{23, 33, 43}.

Durante un ciclo inicial de tratamiento, tales vectores pueden infectar un número apropiado de células y producir una alta expresión de la proteína deseada. Pero pronto, las respuestas celular y humoral desarrolladas por el paciente resultarán en una expresión transitoria del gen terapéutico; ya que los altos niveles de anticuerpos neutralizantes impiden la administración repetida del vector, mientras que los linfocitos T citotóxicos eliminarán a las células que han sido infectadas con el vector adenoviral. Este tipo de respuesta inmune, limita la aplicación de esquemas repetidos de terapia génica y probablemente ha contribuido al fracaso de múltiples protocolos de investigación en fase I^{34, 44, 88, 89}.

Por razones de bioseguridad todos los vectores virales utilizados en protocolos clínicos de terapia génica deben de ser deficientes en su replicación. En teoría los virus pueden ser inhabilitados en su duplicación a través de la eliminación de genes de expresión temprana, que se encuentran ubicados en las regiones E1A y E1B, las cuales codifican para proteínas virales que regulan todas las demás funciones virales. Así, en ausencia de los genes E1, las partículas virales no deberían de replicarse *in vivo*. Sin embargo, cuando estos vectores recombinantes de primera generación son inoculados en el organismo vivo, pueden producir un nivel mínimo o basal de expresión de proteínas virales a pesar de no contar con los genes E1^{56, 64, 78, 81}.

Bajo estas condiciones, las proteínas virales sintetizadas *de novo*, junto con la expresión simultánea del producto de los genes terapéuticos, inducirán la aparición de una respuesta inmune en contra de los antígenos virales.

La respuesta inmunológica observada en modelos animales esta caracterizada por la inmediata aparición de un proceso inflamatorio mediado por neutrofilos, macrófagos y células NK²⁴. El siguiente evento consiste en el establecimiento de una ofensiva citotóxica mediada por linfocitos T auxiliares. Durante esta etapa, las proteínas virales son presentadas por medio de las moléculas clase I del sistema mayor de histocompatibilidad (SMH) a las células T tipo CD8+, las cuales son entonces activadas para formar linfocitos T citotóxicos encargados de destruir a las células infectadas por virus, provocando una disminución en la expresión del gen terapéutico acompañada de inflamación^{88, 89}.

Sincrónicamente, las células auxiliares tipo CD4⁺ son activadas por medio del reconocimiento de proteínas virales presentadas por las moléculas clase II del SMH, estas células juegan un papel de soporte al estimular a los linfocitos T citotóxicos, reforzando así, la respuesta celular inmune. Simultáneamente, se establece una respuesta inmunológica de tipo humoral en la cual los linfocitos B junto con las células auxiliares tipo CD4⁺, son activados por las proteínas de la cápside, presentadas a través de las moléculas clase II del SMH. Esta conjunción de eventos culmina con la producción de anticuerpos neutralizantes que se enlazan con los epítopes de las proteínas de la cápside, impidiendo la incorporación de los virus al ambiente intracelular y obstaculizando la readministración del vector^{80, 83}. Ver la **Figura 7**.

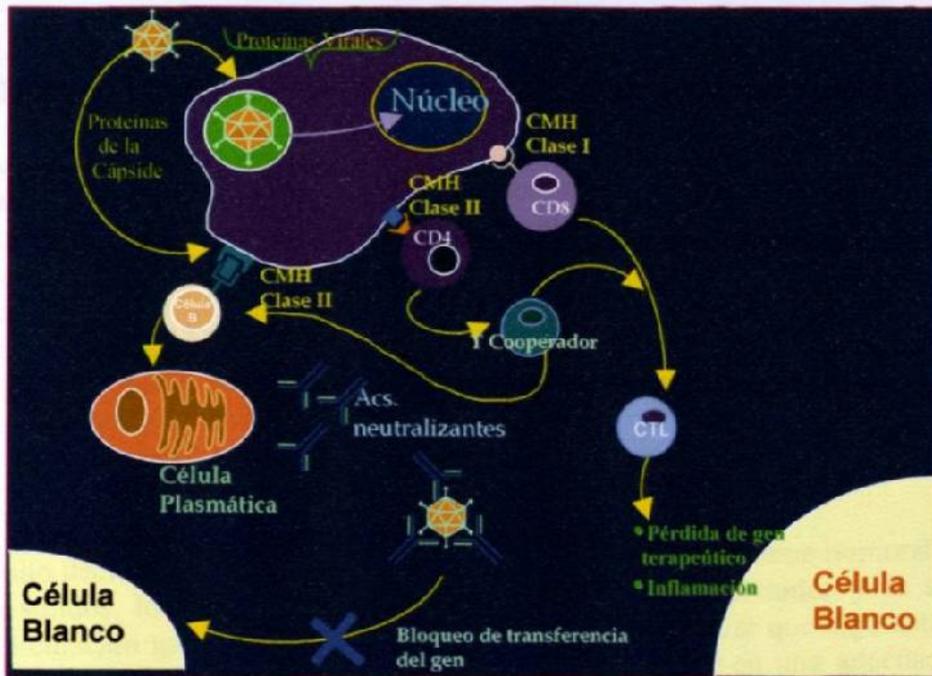


Figura 7. Interferencia inmunológica en la terapia génica con vectores adenovirales. La respuesta inmune montada en contra de las proteínas de la cápside o de las proteínas sintetizadas *de novo* limita la duración de la expresión del gen terapéutico y obstaculiza la administración repetida del virus recombinante.

Considerando que una gran mayoría de los seres humanos han estado expuestos a infecciones por adenovirus a lo largo del tiempo y han desarrollado anticuerpos neutralizantes en su torrente circulatorio y en la mucosa de las vías aéreas. Es lógico suponer, que este tipo de inmunidad protectora se traduce en un importante impedimento para cualquier protocolo de terapia génica basado en la administración de adenovirus. A esta altura, es pertinente puntualizar que en los seres humanos la magnitud de la respuesta inmune no tiene relación con la cantidad de partículas virales administrada, pero si esta íntimamente relacionada con los títulos de anticuerpos pre-existentes y se ve modificada por la ruta de administración del vector. Por otro lado, y a diferencia de los modelos animales, la administración de vectores adenovirales en seres humanos no siempre se traduce en una producción sistémica de anticuerpos neutralizantes^{33,89}.

A la luz de esta evidencia, es sumamente difícil predecir la efectividad de los esquemas de terapia génica en poblaciones humanas. Evidentemente, el desencadenamiento de una respuesta inmune en contra de las proteínas virales o de los productos génicos, pueden limitar la incorporación y distribución de las partículas virales, disminuir su eficacia terapéutica y evitar la administración repetida del vector^{42, 43, 44, 89}.

En contraste con el efecto deletéreo de la respuesta inmune montada contra adenovirus en protocolos clínicos de terapia génica (dirigidos a tratar enfermedades crónico-degenerativas o enfermedades genéticas), la terapia génica del cáncer, presenta un escenario biológico bastante diferente. En el caso de la terapia génica del cáncer, la erradicación del tumor no necesariamente requiere de una prolongada expresión de los genes terapéuticos, situación que es indispensable para el tratamiento de las enfermedades somáticas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ETAPAS EXPERIMENTALES

Los vectores adenovirales están siendo utilizados como vehículos para el transporte de genes en experimentos *in vivo*¹⁶. Una aplicación ideal para el uso de estos vectores es el tratamiento del cáncer mediante esquemas de terapia génica. Los estudios realizados en modelos animales indican que el transporte y expresión de los genes terapéuticos puede ser obstaculizado por el desarrollo de anticuerpos circulantes en contra del vector. Mucha de esta evidencia ha sido obtenida a través de experimentos dirigidos a evaluar los procesos de transferencia y expresión genéticas dentro del hígado y el pulmón^{43,52,66,88,89,90}. El micro-ambiente de estos órganos puede ser particularmente sensitivo a la acción de una respuesta humoral y/o celular, a causa de su epitelio mucoso y a su extensa irrigación sanguínea. Nuestro interés ha sido canalizado ha estudiar la expresión de vectores adenovirales en diferentes circunstancias.

Para este propósito decidimos valorar la participación de la respuesta inmune humoral en el tratamiento de los tumores sólidos, los cuales se encuentran pobremente vascularizados y en algunas ocasiones aislados de la circulación general⁸³. Por lo tanto, es razonable especular que bajo estas condiciones, la inyección intratumoral directa de vectores virales pudiera traducirse en una adecuada transferencia y expresión de los genes terapéuticos, debido a que el parénquima tumoral sería menos sensible a la acción de los anticuerpos circulantes, en relación con otros tejidos con mayor vascularidad. Si esto es cierto, podremos observar una mejor expresión del producto proteico y una mayor extensión de sus efectos terapéuticos, con pocas posibilidades de diseminación sistémica. Ver la **Figura 8**.

Alternativamente, algunos tumores sólidos se encuentran muy vascularizados, por lo que la diseminación de las partículas virales desde el sitio de la inyección, pudiera traer consigo la aparición de reacciones sistémicas o hepato-toxicidad^{6,18,34,76}. Pero paradójicamente, la presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus, pudiera transformarse en un factor de bioseguridad, ya que permitiría administrar dosis masivas de adenovirus por vía intratumoral, sin la diseminación consecuente del vector, garantizando una elevada expresión y persistencia de los genes terapéuticos.

(Ver las Figuras: 9 y 10).

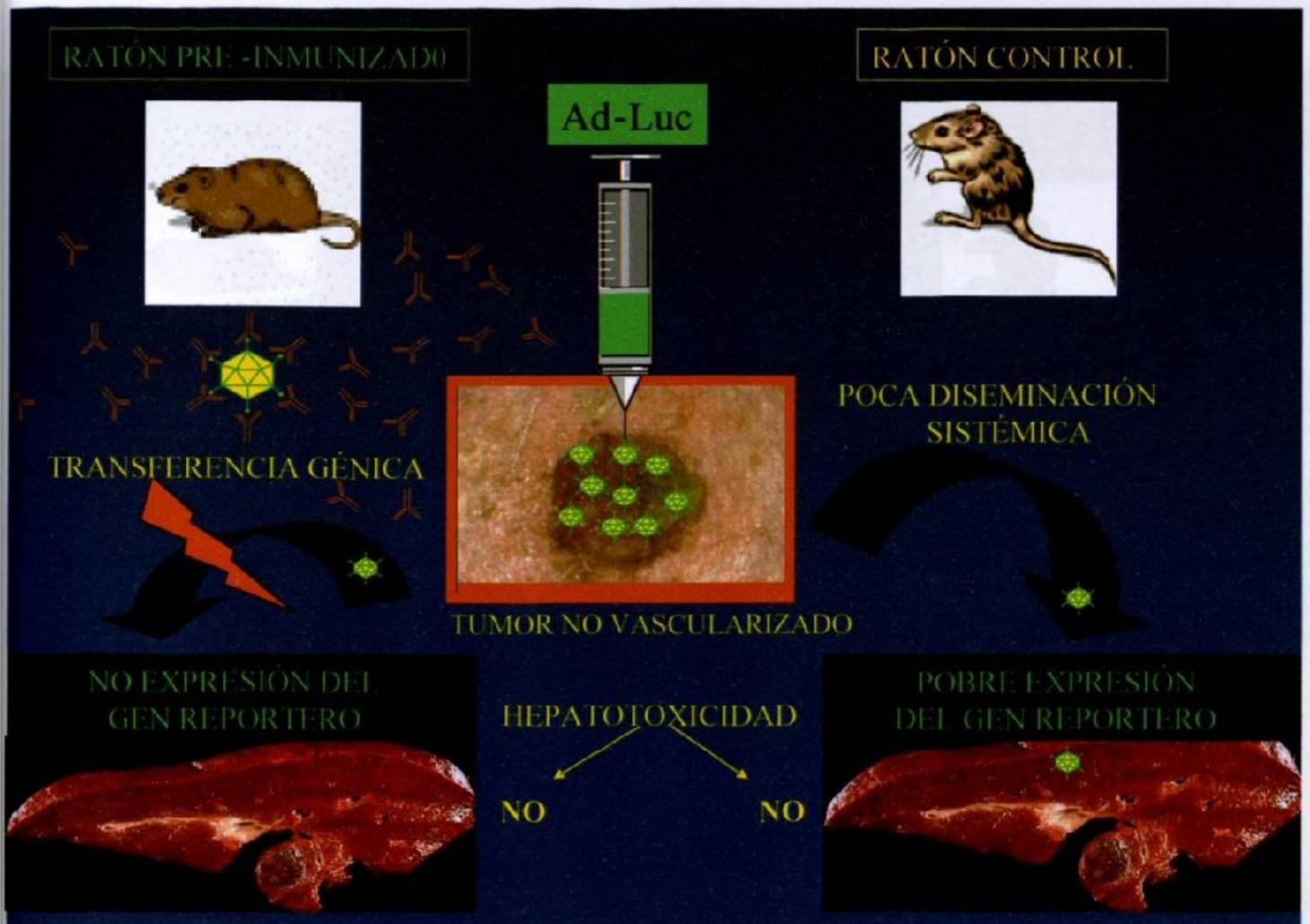


Figura 8. Patrón de diseminación y hepatotoxicidad de un AdV-vector que codifica para luciferasa. En animales control o en ratones preinmunizados, la inyección de AdV-Luc en tumores **no** vascularizados se traduce en una elevada expresión del gen reportero dentro del tumor, así como poca diseminación sistémica con ausencia de hepatotoxicidad.

La ausencia de hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado preinmunizado, la presencia de anticuerpos en contra de adenovirus limita la expresión de AdV en el tumor y obstaculiza su diseminación sistémica.

RATÓN PREINMUNIZADO



Ad-Luc



RATÓN CONTROL.



INYECCIÓN INTRA-TUMORAL EN TUMOR VASCULARIZADO

DISEMINACIÓN SISTÉMICA

HEPATOTOXICIDAD

NO

SI

Bloqueo en la Transferencia Génica



EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO



Figura 9. Posibles escenarios de hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado. En los ratones preinmunizados la presencia de anticuerpos en contra de adenovirus limita la expresión de AdV-Luciferasa dentro del tumor y obstaculiza su diseminación sistémica.

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que el modelo murino preinmunizado es un modelo adecuado para el estudio de la biodistribución y hepatotoxicidad de las partículas de AdV-Luc. El modelo murino preinmunizado permite estudiar la biodistribución y hepatotoxicidad de las partículas de AdV-Luc en un modelo murino preinmunizado con anticuerpos anti-AdV-Luc, lo que evita la aparición de hepatotoxicidad en los ratones preinmunizados.



Figura 10. Biodistribución y hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado que recibe una inyección intratumoral con dosis masivas de AdV-Luc. En este escenario, se observa una elevada expresión de luciferasa a nivel tumoral, mientras que la transferencia y expresión de AdV-Luc a nivel hepático difiere entre animales controles y ratones preinmunizados, debido a que la sobreproducción de anticuerpos evita la aparición de hepatotoxicidad en los ratones preinmunizados.

A la luz de esta evidencia, desarrollamos un estudio pre-clínico en un modelo murino preinmunizado en contra de adenovirus portadores del gen reportero que codifica para la enzima luciferasa. El propósito de este trabajo fue investigar la utilidad de la transferencia génica mediada por adenovirus en el tratamiento de tumores sólidos. Para tal efecto, decidimos demostrar como la preinmunización intratumoral con adenovirus modifica el nivel de expresión de las proteínas reporteras. Adicionalmente, intentamos corroborar si la presencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en el torrente circulatorio, pueden limitar la diseminación sistémica del vector después de la inyección intratumoral directa, sin disminuir la transferencia y expresión genéticas.

En caso de corroborar que la presencia de anticuerpos neutralizantes interfiere con una adecuada expresión de los genes reporteros, procedería^{18,34,83,76}, disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de enmascarar su superficie recubriéndola con polímeros de Polietilenglicol (PEG), proceso denominado "pegilación".

La PEGilación es un método ya utilizado para disminuir la antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas terapéuticas¹⁵. Existen dos importantes limitaciones de las reacciones de PEGilación: la primera consiste en una disminución de la bio-actividad del complejo PEG-proteína. La segunda limitación depende de la incorporación del grupo activado dentro del complejo PEG-Proteína, y no obstante que el PEG es por si mismo inmunológicamente inerte, la incorporación de esos grupos residuales puede desencadenar una respuesta inmune. Ambos problemas pueden ser evitados por medio de la optimización biológica del método de PEGilación utilizando Tresa-mono metoxipolietilenglicol (TMPEG)²⁰.

Con estos antecedentes, decidimos utilizar el método de optimización biológica de polímeros de PEG para probar si los vectores adenovirales portadores de genes reporteros o terapéuticos pueden ser modificados en su inmunogenicidad reteniendo su capacidad infectiva. Nuestro propósito se fundamenta en el hecho ya conocido de que algunos componentes proteicos de la cápside viral -como las proteínas fibrosas, los pentones y hexones- se unen preferentemente con los anticuerpos neutralizantes durante el establecimiento de una respuesta inmune. Ver la **Figura 11**.

Dentro de todo este contexto, hemos utilizado un modelo murino pre-inmunizado a través de la inyección intratumoral de adenovirus, con la finalidad de investigar la utilidad de la transferencia génica mediada por adenovirus en el tratamiento de tumores sólidos. Para el logro de esta finalidad decidimos estudiar los siguientes postulados:

- 1.- La inyección intratumoral de vectores adenovirales que transportan genes terapéuticos o genes reporteros provoca el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en contra de los antígenos virales.
- 2.- En modelos murinos, la inmunidad humoral pre-existente en contra de adenovirus obstaculiza la transferencia génica y limita la expresión intratumoral y/o sistémica de los genes terapéuticos.
- 3.- Después de la inyección intratumoral del vector, la elevación de anticuerpos en el torrente sanguíneo limita la diseminación sistémica del vector, sin afectar la transducción de las células tumorales.
- 4.- La utilización de dosis crecientes de adenovirus en ratones pre-inmunizados puede restablecer una adecuada expresión de los genes terapéuticos sin incrementar el riesgo de diseminación sistémica del vector.
- 5.- La respuesta inmune humoral es insuficiente para evitar la diseminación del vector hacia los tejidos para los cuales los adenovirus exhiben un tropismo selectivo, por lo cual es posible predecir la aparición de fenómenos de hepato-toxicidad, después de la inyección intratumoral de vectores adenovirales.
- 6.- La inmunogenicidad de los adenovirus puede ser atenuada a través de su encapsulación con polímeros de polietilén glicol.

Para de dar cumplimiento a cada uno de estos enunciados, este trabajo se dividió en tres importantes etapas:

Primera etapa: Dirigida a evaluar el efecto de la inmunidad sobre la expresión de los genes reporteros.

El primer paso de esta etapa fue destinado a estandarizar un modelo murino de tipo heterotópico, que permitiera el trasplante singénico de la línea celular TM40-D (que produce tumores mamarios en el ratón) en el tejido celular subcutáneo de ratonas Balb/c. El segundo paso consistió en estudios inmunológicos destinados a evaluar los niveles de anticuerpos específicos en contra de adenovirus, así como la titulación de anticuerpos neutralizantes. Posteriormente, se determinó su posible relación con los procesos de transferencia y expresión génica de los genes reporteros.

Segunda etapa: Se investigó si con la inyección intratumoral de dosis crecientes de adenovirus en ratones normales y preinmunizados, es posible obtener altos grados de expresión genética de los genes reporteros, sin presentar complicaciones de diseminación sistémica del vector o aparición de fenómenos de hepatotoxicidad.

Tercera etapa: Fue dirigida a disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de su encapsulación (PEGilación) con polímeros de polietilenglicol.

4. JUSTIFICACIÓN

Los tumores malignos que afectan a los seres humanos son usualmente curables si se detectan en etapas tempranas de su desarrollo. En los Estados Unidos de América, las tasas de mortalidad han disminuido significativamente durante la última década, debido a los sistemas de detección precoz y a un mejor tratamiento de las lesiones precancerosas, así como de tumores en estadios tempranos de desarrollo.

Asimismo, el perfeccionamiento de los métodos diagnósticos a nivel molecular, ha mejorado los aspectos pronósticos y las expectativas de vida de muchos pacientes con cáncer. Sin embargo, aún queda mucho por hacer. Siendo optimistas, tal vez en corto tiempo mediante el uso de estrategias de terapia génica sea posible lograr la destrucción selectiva y efectiva de las células tumorales.

Dentro del campo de las aplicaciones de la terapia génica en el hombre, se puede considerar al cáncer como el área más importante y de más rápida expansión. Durante los últimos 5 años un 75% de los pacientes enlistados en protocolos de terapia génica han recibido el tratamiento para la erradicación de neoplasias malignas, principalmente tumores. La justificación del tratamiento radica en el fácil abordaje y biodisponibilidad de los tumores sólidos y a la facilidad de lograr una rápida y eficiente acumulación del gen terapéutico dentro del parénquima tumoral. Bajo estas condiciones, la expresión transitoria de los genes terapéuticos puede ser una ventaja adicional, ya que disminuye el riesgo de toxicidad sistémica, garantizándose una exposición aguda -aunque de corta duración- de las células tumorales a los efectos de las pro-drogas.

Dentro de este escenario, el factor de limitación más importante es la condición de inmunogenicidad de los vectores virales. Por tal motivo, la mayor parte de los experimentos pre-clínicos realizados *in vivo* se han efectuado en modelos murinos inmuno-deficientes o en animales inmuno-deprimidos. Por lo tanto, resulta muy difícil predecir que tan efectivos pueden ser ese tipo de tratamientos en los seres humanos previamente expuestos a los adenovirus.

Por otro lado, pudiera parecer conveniente conservar un adecuado estado de inmuno-competencia para coadyuvar con la eliminación de las células cancerosas. Sin embargo, esto no es deseable, ya que en la práctica, la producción de anticuerpos contra adenovirus contribuye más a la eliminación del vector terapéutico, que a la erradicación de las células neoplásicas.

Con base a estos antecedentes, se justifica investigar la utilidad de inocular vectores adenovirales por medio de la inyección directa del vector dentro del parénquima de tumores sólidos y evaluar si la pre-inmunización contra adenovirus puede modificar la eficacia terapéutica de los esquemas de terapia génica utilizados en el tratamiento del cáncer. La importancia de esta nueva área de investigación es incuestionable, sobre todo si tomamos en consideración la gran cantidad de variables que interfieren con el tratamiento integral y exitoso de los pacientes con cáncer.

Una justificación adicional deriva del conocimiento que los esquemas tradicionales de tratamiento del cáncer consisten en el uso de cirugía en combinación con radioterapia o quimioterapia. Sin embargo, una gran variedad de tumores malignos y los carcinomas diseminados no son controlables por cirugía y no responden a terapias alternativas. Consecuentemente, las expectativas de vida a largo plazo por lo general no exceden del 15% al 30%.

A causa del limitado impacto que tienen la cirugía y la radioterapia en el tratamiento de los pacientes con cáncer, se justifica desarrollar nuevos métodos terapéuticos, que permitan mejorar las expectativas de vida y evitar la aparición de complicaciones.

Dentro de las nuevas opciones terapéuticas se encuentra la terapia génica, la cual es improbable que reemplace a los esquemas terapéuticos ya existentes, no obstante, puede contribuir de manera significativa en el tratamiento de cánceres refractarios al tratamiento convencional y en el control de la enfermedad metastásica. Debido a su enorme potencial para inducir la regresión del crecimiento tumoral, sin la presentación de toxicidad agregada.

5. HIPOTESIS

5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

H1.

En el ratón preinmunizado que recibe una inyección intratumoral de adenovirus portadores de los genes GFP/Luc, la eficacia en la transducción y expresión de los genes reporteros será modificada por la presencia de anticuerpos circulantes. Los niveles de expresión intratumoral a lo largo del tiempo serán modificados por la presentación de anticuerpos neutralizantes.

H2.

La inyección intratumoral de altas dosis de adenovirus en ratones preinmunizados, restablecerá los niveles de expresión génica de los genes reporteros sin presentar complicaciones secundarias a la diseminación sistémica del vector.

H3.

De presentarse la inmunidad humoral en contra de adenovirus, esta puede ser ventajosa, ya que evita la diseminación del vector, mientras permite un adecuado nivel de transferencia y expresión genética de los genes de interés.

H4.

La respuesta humoral provocada por los anticuerpos neutralizantes en contra del vector adenoviral, puede ser atenuada a través de la encapsulación de los vectores adenovirales con polímeros de polietilenglicol (TPMG).

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar si la inyección intratumoral de vectores adenovirales induce o no la producción de anticuerpos neutralizantes en contra de subsecuentes inyecciones de los vectores modificando la eficiencia de la expresión de genes reporteros portados por éstos.
2. Determinar si en el caso de montarse una respuesta inmune, la inyección intratumoral subsecuente de dosis crecientes de vectores adenovirales, se traduce en una elevada expresión de la proteína reportera en el sitio de inyección, sin presentar diseminación sistémica de las partículas virales administradas.
3. Evaluar los aspectos de toxicidad general y de hepatotoxicidad asociados con la inyección de dosis crecientes de adenovirus en ratones preinmunizados, a través de la cuantificación de enzimas hepáticas (Alaninaminotransferasa, Aspartatoaminotransferasa y Fosfatasa Alcalina) y de la evaluación anatomopatológica de diferentes tejidos (Hígado, Bazo, Ovario, Pulmón, y Corazón) extraídos de cada uno de los animales pertenecientes al estudio.
4. Determinar si la encapsulación de adenovirus con TMPEG disminuye la inmunogenicidad del vector o lo torna resistente a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Reproducir un modelo murino de tipo heterotópico para generar tumores mamarios en el espacio celular subcutáneo de ratonas de la cepa Balb/c.
- B. Estandarizar las condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de la línea celular TM-40D, destinada a generar tumores mamarios singénicos.
- C. Conocer el tiempo que se necesita para generar tumores sólidos en los animales en estudio y definir el número de células necesario para producir dichas neoplasias.
- D. Inducir la generación de tumores singénicos en ratonas de la cepa Balb/c, mediante su inoculación con células de la línea TM-40D, por vía subcutánea.

E. Preinmunizar una población de ratones por medio de la inyección de diferentes vectores adenovirales utilizando diferentes vías de inoculación, y determinar los niveles de producción de anticuerpos antes y después de la inoculación del adenovirus.

F. Correlacionar el nivel de producción de anticuerpos con los niveles de expresión genética de los genes reporteros GFP/Luciferasa administrados por subsecuentes inyecciones de vectores adenovirales que los portan, y determinar si ambas variables son modificadas al utilizar diferentes vías de administración del vector.

G. Efectuar los correspondientes ensayos de luciferasa, inmunofluorescencia, anticuerpos neutralizantes, y ELISA en muestras de hígado, piel, ovario, bazo y tumor, así como en el suero de cada uno de los animales en estudio.

H. Evaluar la transferencia y expresión de luciferasa en un grupo adicional de ratones con inmunidad pre-existente en contra de Ad-5, a los cuales se les administrarán dosis crecientes de Ad/Luc por medio de la inyección intratumoral del vector.

I. Evaluar los títulos de las enzimas hepáticas Alanin aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) en el suero de los animales preinmunizados que recibieron dosis crecientes de adenovirus y compararlo con los títulos reportados en los animales control.

J. Realizar estudios anatomopatológicos en el hígado, bazo y pulmón de los animales tratados, con la finalidad de detectar cambios morfológicos, necrosis o inflamación tisular.

K. Encapsular los vectores adenovirales AdLuc, AdGFP y AFT2M mediante una reacción de PEGilación y valorar si la expresión genética de las proteínas codificadas por estos genes reporteros se ve modificada en presencia y ausencia de anticuerpos neutralizantes en contra de adenovirus.

7. MATERIAL Y METODOS

El Presente trabajo de tesis se realizó en el Gene Vector Laboratory, Feigin Cancer Center, Texas Children's Hospital & Baylor College of Medicine., el Radio-Gene Therapy Laboratory del Veterans Affairs Medical Center de Houston Texas., y en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. México.

7.1 MATERIAL

7.1.1 VIRUS Y VECTORES:

Los vectores adenovirales utilizados en este estudio pertenecen a la subclase C, serotipo Ad-5 de la familia Adenoviridae. Estos fueron construidos por el Dr. Estuardo Aguilar-Cordova, según el método propuesto por Rosenfeld y Bett⁴ dentro del Gene Vector Laboratory del Center for Cell and Gene Therapy del Baylor College of Medicine, de acuerdo a las normas de las buenas prácticas de laboratorio utilizando condiciones estándar.^{5,32,78}

El primer vector (Adv-GFP) expresa una proteína reportera regulada por el promotor de CMV. La secuencia de DNA exógeno se insertó dentro de la región E1 y codifica la secuencia de 238 aminoácidos de la proteína verde fluorescente o GFP. La GFP se presenta en forma de monómero en solución, y emite luz verde cuando es excitada con luz ultravioleta o luz azul, por lo que es fácilmente detectada por microscopía de inmunofluorescencia. Este vector fue utilizado para preinmunizar los primeros grupos de animales. Adicionalmente fue utilizado para conocer los niveles de expresión del *gen reportero desde un punto de vista cualitativo*.

Para determinar la expresión cuantitativa de los genes reporteros se utilizó un segundo vector (Adv-Luc) de origen humano, portador de una secuencia exógena, que codifica para una proteína enzimática conocida como luciferasa (una proteína monomérica de 62 kDa). Adv-Luc, contiene un casete de expresión en la región E1, construido con el promotor de Citomegalovirus (CMV), el DNA_c que codifica para luciferasa y la señal de poli-adenilación de SV40.

Ambos vectores adenovirales fueron propagados en células 293 y posteriormente purificados por centrifugación diferencial en gradientes de cloruro de cesio^{3,61}. Finalmente, durante la etapa de preinmunización se utilizó el Adv-5 AFT2M59 carente de genes reporteros ("gutless"), el cual fue empleado para inducir la producción de anticuerpos en el grupo de animales pre-inmunizados.

7.1.2 ANIMALES.

Durante cada una de las diferentes etapas de este programa de investigación se utilizaron ratones de 6 semanas de edad pertenecientes a la cepa Balb/c, de 20g de peso y del sexo femenino (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN). También se utilizaron ratones inmunodeficientes de la cepa RAG-2 (recombinase activating 2 gene). Los ratones homocigotos para la mutación en el gen RAG-2 carecen de células B y células T, ya que la deleción de este gen ocasiona un bloqueo en la diferenciación temprana de estas líneas celulares.

Los procedimientos efectuados en los animales, fueron realizados en los bioterios del Feigin Cancer Center del Baylor College of Medicine y del Veterans Affairs Medical Center, de Houston Texas. Como criterio de terminación del experimento se decidió sacrificar a los animales con un crecimiento tumoral mayor de 2250 mm³ o de un peso igual o mayor al 10% del peso corporal. También se sacrificaron los animales enfermos que presentaron caquexia, dificultad respiratoria, hipoactividad y ataque a su estado general. La eutanasia se efectuó por asfixia en una atmósfera saturada con CO₂.

7.1.3 LÍNEAS CELULARES

Para inducir el crecimiento de tumores en los animales experimentales se utilizó la línea celular TM40-D. Esta línea se deriva de ratonas vírgenes normales de la cepa Balb/c y se generó a partir de células murinas del epitelio mamario (FSK) cultivadas durante períodos de tiempo variable. Las células FSK fueron inyectadas en el tejido adiposo de las almohadillas mamarias de modelos murinos y después de 11 pasajes seriados las células transplantadas generaron tumoraciones alveolares preneoplásicas con gran capacidad de tumorigénesis⁴⁷.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 ENSAYO DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para determinar los niveles de anticuerpos específicos en contra de adenovirus en el plasma de los animales preinmunizados y en los animales controles, se utilizó un método indirecto de ELISA⁹³, en donde el adenovirus-5 AFT2M59 fue utilizado como antígeno. Para este propósito se utilizó una solución de 8.87×10^{12} VP/ml, las partículas virales fueron fijadas por enlaces no covalentes en la base de una microplaca de titulación con 96 celdillas y el exceso de antígeno se lavó con una solución de amortiguador de fosfatos y detergente tween 20 (Phosphate Buffered Saline Plus Tween 20 (20X). Cat. RP 0014. ScyTek Laboratories. Logan Utah, U.S.A). Las celdillas fueron llenadas con superblok blocking buffer en PBS (Pierce. Rockford, Illinois. U.S.A. Cat. No. 37515) para bloquear los epítopes inespecíficos de las proteínas que pudieran unirse con los anticuerpos y obstaculizar el ensayo. Enseguida, se añadieron las muestras de suero en las celdas correspondientes; cualquier anticuerpo específico contra adenovirus se uniría a la fase sólida. El complejo de antígeno-anticuerpo fue cuantificado por medio de una técnica de "sándwich" utilizando un conjugado de anti-inmunoglobulina-enzima (Pierce Cat. No. 32490.), el cual se une al anticuerpo anti-Ad-5 previamente fijado en la fase sólida. Finalmente, se añade el substrato para la enzima (3,3',5,5'-tetramethyl Benzidine Substrate Solution. Pierce Cat. No. 3402.) que produce una reacción colorimétrica, la cual es cuantificada como un incremento en la absorbancia a través de un espectrofotómetro (ELX800 Universal Microplate Reader Bio-Tek Instruments). Ver la **Figura 12**.

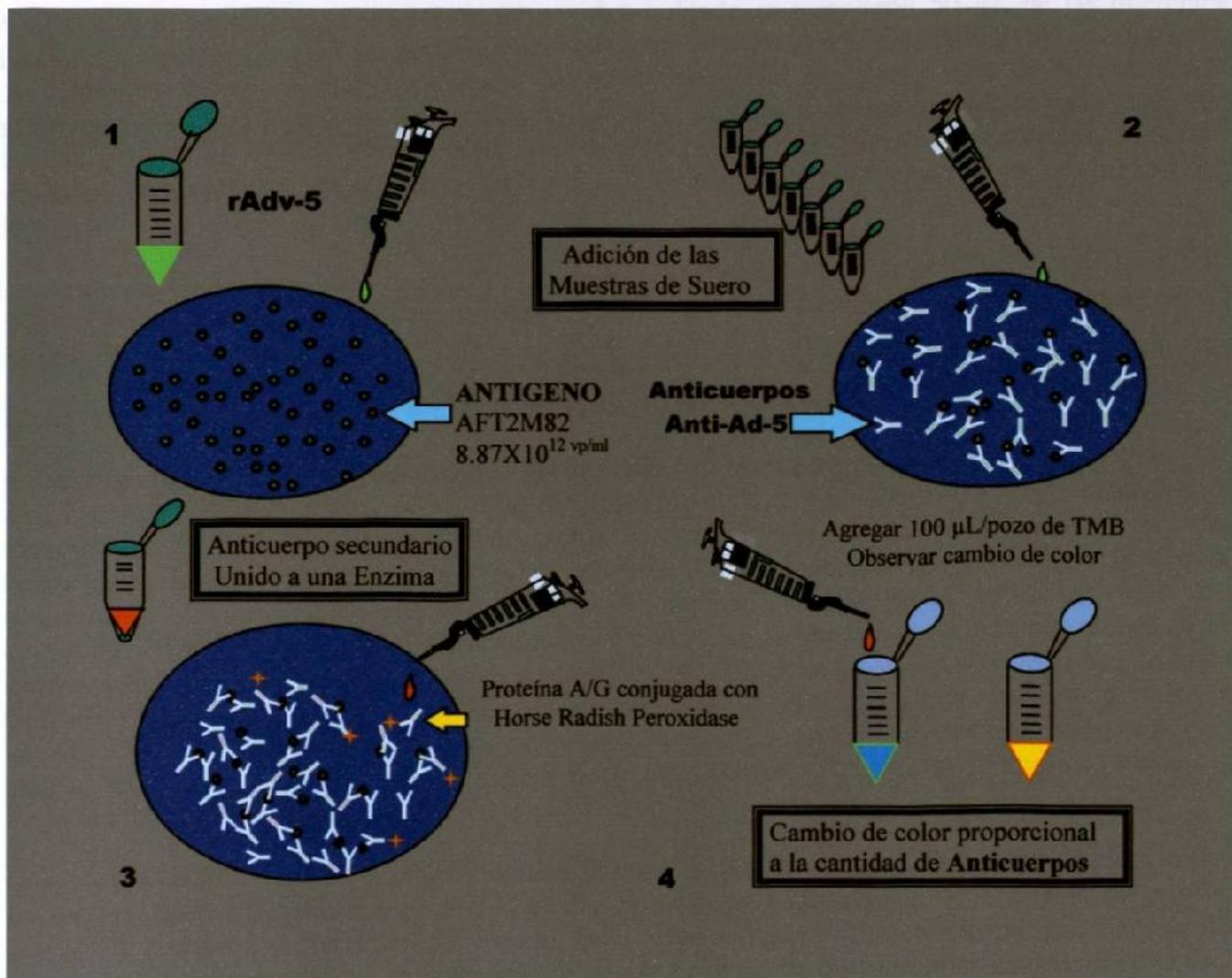


Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA. El procedimiento se explica por medio de cuatro pasos secuenciales: el primero es la fijación del antígeno en el fondo de la placa, el segundo es la formación del complejo antígeno-anticuerpo, el tercero es la formación de un sándwich mediante la unión del primer y segundo anticuerpo, y el cuarto es la producción de una reacción colorimétrica después de la reacción enzima-substrato.

7.2.2 ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN DE ADENOVIRUS

Esta técnica, se realiza en células en cultivo y tiene como finalidad medir la capacidad de los anticuerpos -específicos contra adenovirus- para inhibir la infección (lisis) de las células por las partículas virales en estudio. Usualmente, el anticuerpo es mezclado con el agente viral y posteriormente incubados por un tiempo variable. Posteriormente, la mezcla es agregada al cultivo de células. El título de neutralización es visualizado como un marcador subrogado de la habilidad del anticuerpo para prevenir la infección *in vivo*²³.

Para tal efecto, Se emplearon placas de 96 cavidades donde se mezclaron 50 μ L de las diferentes diluciones del suero con igual volumen de cada uno de los aislamientos virales (100 TCID₅₀ U_i/0.05ml). Las diluciones fueron realizadas en medio MEM suplementado con suero fetal de ternera al 2% inactivado por calor. Después de incubar durante 1 h a 37 °C, se adicionaron 100 μ L de una suspensión de células Vero -en medio 199 con suero fetal de ternera al 10 % - a una concentración de 2X10⁵ células/ml. Enseguida las placas fueron incubadas a 37⁰C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 3-5 días.

Los resultados fueron obtenidos cuando el título de infectividad del virus fue de 30 a 300 TCID₅₀ U_i. El título de neutralización fue considerado como \geq 50% del efecto citopático (CPE) comparado con el control.

7.2.3 ENSAYO DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP-ASSAY).

A pesar de que los vectores adenovirales pueden infectar a un gran número de células, existe gran variación en el grado de transducción entre diferentes tipos de tejido. Con el objeto de cuantificar la eficiencia en la transducción de los diferentes vectores virales, se ha modificado su genoma, insertándoles genes exógenos que expresan marcadores biológicos con actividad enzimática o de luminiscencia. Un ejemplo de este tipo de vectores que codifican para genes reporteros, es el Adv-Luciferasa, en donde la actividad de la proteína reportera es fácilmente detectada por medio de un ensayo enzimático⁶¹. Aunque los ensayos enzimáticos para detectar proteínas reporteras son de suma utilidad en la cuantificación de las proteínas reporteras, ninguno de ellos permite visualizar la presencia *-in situ-* del gen reportero y por ende de la partícula viral que lo transporta. Por esta razón decidimos utilizar Adv-GFP para demostrar la eficacia de la transferencia y expresión génicas después de la inyección intratumoral de Adv-GFP.

La expresión de GFP fue visualizada utilizando un microscopio de inmunofluorescencia. Para tal efecto, los animales fueron sacrificados a los 2, 7, 14 días después de la inoculación de Adv-GFP, luego se les practicó la necropsia y extracción del hígado, bazo, ovario y tumor. Posteriormente, cada órgano fue observado bajo el microscopio de fluorescencia con la finalidad de obtener un estudio cualitativo de la expresión de GFP mediada por adenovirus, como se muestra en la **figura 13**.

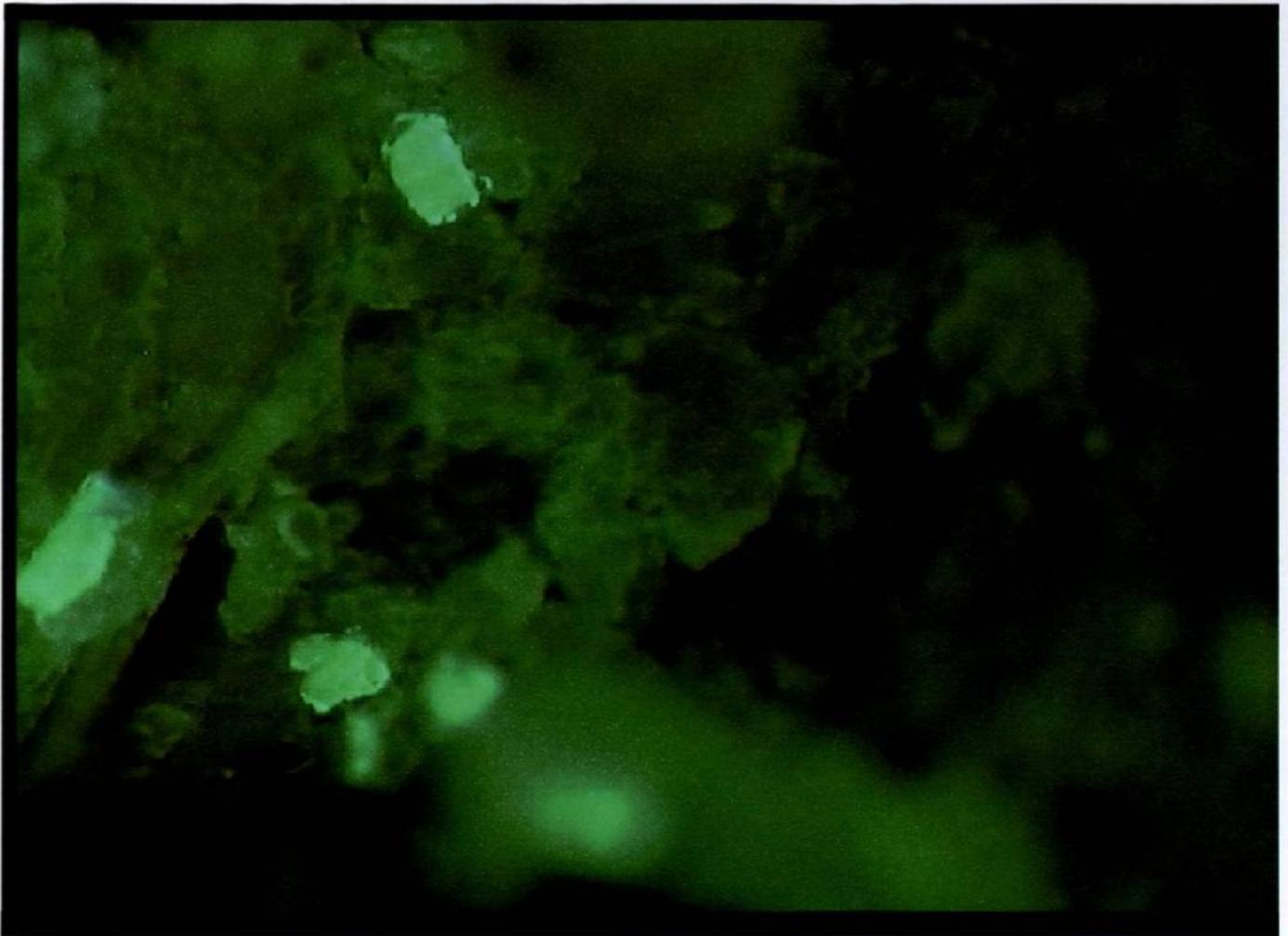


Figura 13. Microfotografía de células tumorales transducidas con AdV-GFP. Nótese la emisión de fluorescencia emitida por la proteína reportera expresada por el transgen en aquellas células que han sido transducidas con el vector.

7.2.4 ENSAYO DE LUCIFERASA

Para determinar cuantitativamente los niveles de expresión de los genes reporteros se utilizó un adenovirus portador de la secuencia reportera que codifica para luciferasa. La actividad de la enzima fue determinada por medio del ensayo de luciferasa (Promega Madison, WI. U.S.A. Cat. E1500). Para iniciar el ensayo, cada tejido/órgano fue lavado con buffer de fosfatos y cada muestra fue colocada en tubos de polipropileno conteniendo 2 ml de buffer de lisis [25 mM Tris -phosphate pH 7.8, 2 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM 1,2 diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100]. Posteriormente, cada uno de los tejidos en estudio fue sometido a homogenización mecánica utilizando un homogenizador (Ultra-Turrax laboratory disperser/homogenizer, IKA works # 27950-00). Cada homogenizado fue sometido a centrifugación a 2000 RPM X 2min, con la finalidad de eliminar el sedimento de detritus celulares, mientras que el sobrenadante fue almacenado a -80°C . Para medir la actividad de luciferasa se mezclaron 20 μl de cada homogenado con 100 μl del reactivo de luciferasa [20Mm tricine, 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \text{Mg} (\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67 Mm MgSO_4 , 0.1 Mm EDTA, 33.3 Mm DTT, 270 μM coenzyme A, 470 μM luciferina, 530 μM ATP, final pH 7.8]. Inmediatamente después se cuantificó la emisión de luz durante un período de 10 segundos en un luminómetro modelo TD-20/20. (Ver la **Figura 14.**)

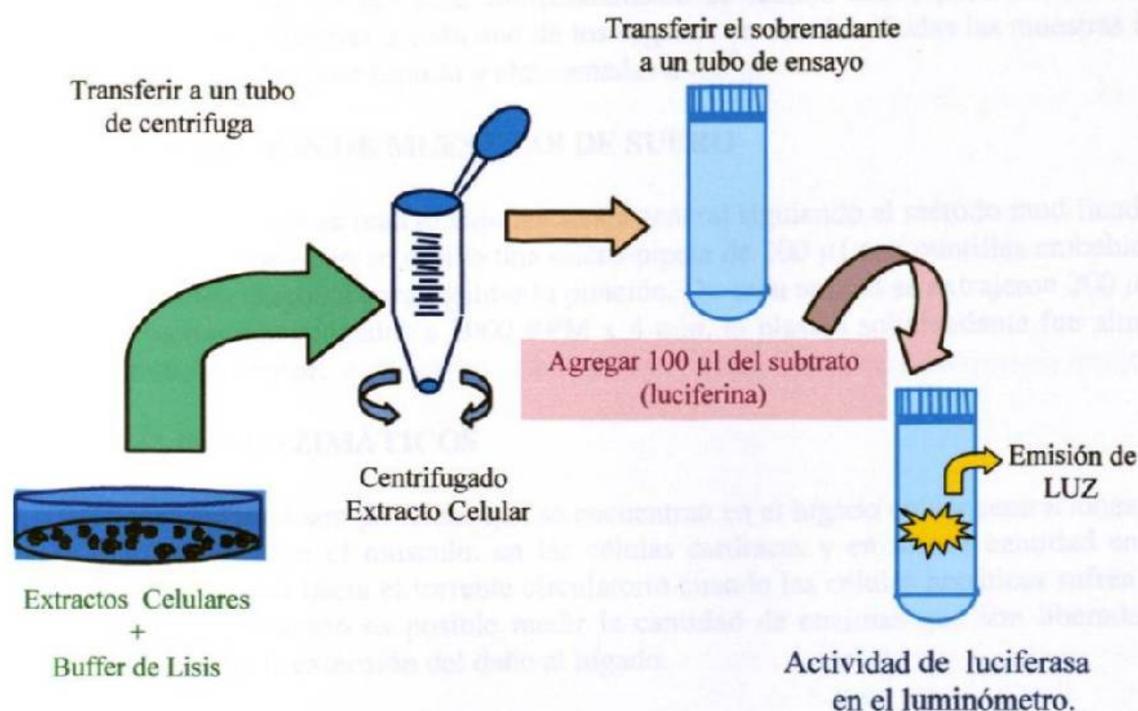


Figura 14. Ensayo de luciferasa. Las reacciones químicas que ocurren durante el ensayo de luciferasa producen luz. Los componentes de la reacción son: el oxígeno, el substrato luciferina y la enzima luciferasa. El oxígeno se pone en contacto con la luciferina y la oxida, en presencia de la luciferasa, para formar luciferina oxidada. La energía necesaria para la reacción proviene del ATP. Una vez formada la luciferina oxidada, ella se descompone espontáneamente y se regeneran la luciferina inicial y el oxígeno, y el exceso de energía que fue facilitada por el ATP es liberada en forma de luz.

7.2.5 TUMORIGÉNESIS

Para establecer el modelo de tumorigénesis se utilizó la línea celular TM40-D con la finalidad de producir una fenocopia de tumores ortotópicos en ratones Balb/c y poder investigar los efectos de la respuesta inmune humoral sobre la transferencia y expresión genéticas de tumores inyectados con vectores adenovirales. Para este propósito, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (NembutalR, Abbott Laboratories, Chicago, IL) a una dosis de 50 mg/kg. Posteriormente, cada animal fue inoculado con células TM40-D a una concentración de 6×10^6 , la inyección se efectuó por vía subcutánea en el flanco posterior derecho con un volumen de 50 μ l.

Después de un período de tumorigénesis de 3-4 semanas -en el cual los tumores alcanzaron un diámetro de 50 a 60 mm³,- los animales fueron inmunizados con dos diferentes vectores virales (ADV-GFP o AFT2M59) a una dosificación de 1×10^{11} VP/20 μ l. Para evaluar el crecimiento tumoral los tumores fueron medidos cada 4 días en sus 2 ejes perpendiculares, utilizando un calibrador digital tipo vernier; el volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula $(a \times b^2)/2$, en donde a es el eje mayor y b es el eje menor del tumor⁶⁰.

7.2.6 RECOLECCIÓN DE TEJIDOS.

Para la obtención de las muestras de hígado, bazo, ovario, pulmón y tumores, se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical. Inmediatamente se realizó una laparotomía a cielo abierto y se procedió a disecar y remover a cada uno de los órganos en estudio. Todas las muestras fueron colocadas en recipientes con nitrógeno líquido y almacenadas a -80⁰C.

7.2.7 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

La extracción de sangre se realizó bajo anestesia general siguiendo el método modificado de punción del seno retro-orbital, para ello se utilizó una micro-pipeta de 200 μ l con puntillas embebidas de heparina y cortadas en forma diagonal para facilitar la punción. De cada animal se extrajeron 200 μ l de sangre total, los cuales fueron centrifugados a 2000 RPM x 4 min, el plasma sobrenadante fue almacenado a -80⁰C para su estudio posterior.

7.2.8 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Las enzimas hepáticas son proteínas que se encuentran en el hígado en concentraciones altas, también es posible encontrarlas en el músculo, en las células cardiacas y en menor cantidad en la sangre. Estas enzimas son liberadas hacia el torrente circulatorio cuando las células hepáticas sufren daño. Por medio de ensayos de laboratorio es posible medir la cantidad de enzimas que son liberadas por las células hepáticas y estimar la extensión del daño al hígado.

Para la determinación de la actividad de enzimas hepáticas se cuantificaron los títulos de las enzimas Alanina Aminotransferasa (ALT), Aspartato Aminotransferasa (AST) y Fosfatasa Alcalina (ALP). Los valores respectivos son reportados en Unidades Internacionales por Litro.

7.2.9 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Durante la necropsia de los animales se procedió a recolectar los diferentes tejidos bajo estudio. Cada órgano fue sumergido en formol, después de su fijación los bloques fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. Los cortes se realizaron en un microtomo, obteniéndose una cinta de rebanadas de tejido de 5 a 8 micras de espesor. Finalmente, los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina y se examinaron con el microscopio de luz.

El hígado, pulmón y bazo de cada animal fueron examinados para la búsqueda de hepatitis, neumonía intersticial e hiperplasia esplénica. Los cambios histológicos fueron catalogados con una escala del 0 al 4, en donde el cero representa la morfología normal y el 4 severa inflamación, hiperplasia o necrosis.

7.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos durante los ensayos de luciferasa, ELISA y anticuerpos neutralizantes en los diferentes grupos de estudio, se realizó por medio de la prueba T de Student y del análisis de varianza unidireccional.

El análisis de varianza unidireccional (oneway ANOVA). Es una prueba estadística para analizar si más de dos grupos difieren significativamente entre sí, en cuanto a sus medias y varianzas. El análisis de varianza unidireccional produce un valor conocido como "*F*" o razón "*F*", que se basa en una distribución muestral, conocida como la *distribución "F"*. La razón "*F*" compara las variaciones en las puntuaciones debidas a dos diferentes fuentes: Variaciones *entre* los grupos que se comparan y variaciones dentro de los grupos.

El análisis de varianza fue utilizado para probar la hipótesis de que varias medias son, o no iguales y es una extensión de la prueba "*t*", ya que la prueba "*t*" es utilizada para dos grupos mientras que el análisis de varianza unidireccional se usa para tres, cuatro o más grupos.

Una vez que determinamos las diferencias que existen entre las medias fue conveniente conocer cual de las medias fue la que difirió. Como el análisis de varianza unidireccional solamente nos señala si la diferencia entre las medias y las distribuciones de los grupos es o no significativa, pero no nos indica a favor de que grupo lo es. Adicionalmente decidimos comparar cada par de medias y determinar exactamente en donde pueden estar las diferencias significativas. Para tal propósito se utilizó un contraste a posteriori, comparando las medias y las distribuciones dentro de los grupos.

Para el correcto cumplimiento de cada uno de estos puntos, utilizamos un paquete estadístico para computadora (SPSS Versión 11.0), el cual contiene pruebas estadísticas para contrastes a posteriori en el análisis de varianza unidireccional. Nosotros utilizamos la prueba de diferencia significativa mínima (LSD) y la prueba "post hoc" de comparaciones múltiples. El valor α (alfa) que se eligió para nuestro estudio fue a un nivel de significancia del .05 expresado en términos de probabilidad (p).

7.2.11 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRIMERA ETAPA: Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros.

Durante la etapa inicial de nuestro programa de investigación se utilizó una población de 45 ratonas de la cepa Balb/c a las cuales se les provocó la aparición de tumores mediante la inyección de 1×10^6 células TM40-D. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de CO_2 utilizando medio D-MEM suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Cuando la confluencia celular fue cercana al 80%, las células en monocapa fueron lavadas con PBS y posteriormente tratadas con tripsina al 5%, después de un nuevo lavado y centrifugado, las células fueron contadas, resuspendidas en D-MEM y finalmente inyectadas en la región dorso-lateral de cada uno de los animales bajo estudio.

Después de un período de tumorigénesis de 4 semanas los animales fueron agrupados en 3 diferentes grupos de estudio e inmunizados de la manera siguiente:

El Primer grupo quedó conformado por 15 ratones inoculados por *vía subcutánea* con el vector adenoviral portador del gen reportero GFP. La cantidad de vector inoculada fue de 1×10^{11} VP en $20 \mu\text{l}$. El segundo grupo de estudio quedó integrado por 15 ratones inoculados con la misma dosis del vector pero por *vía intratumoral*, mientras que el grupo control no recibió adenovirus y sólo se le inyectó por *vía subcutánea* Tris-GVL buffer. Adicionalmente, se inyectaron 5 ratones inmunodeficientes RAG-2, los cuales fueron utilizados como segundos controles, ya que aunque recibieron la inyección de adenovirus, no tienen capacidad de generar anticuerpos. Ver la **Figura 15**.

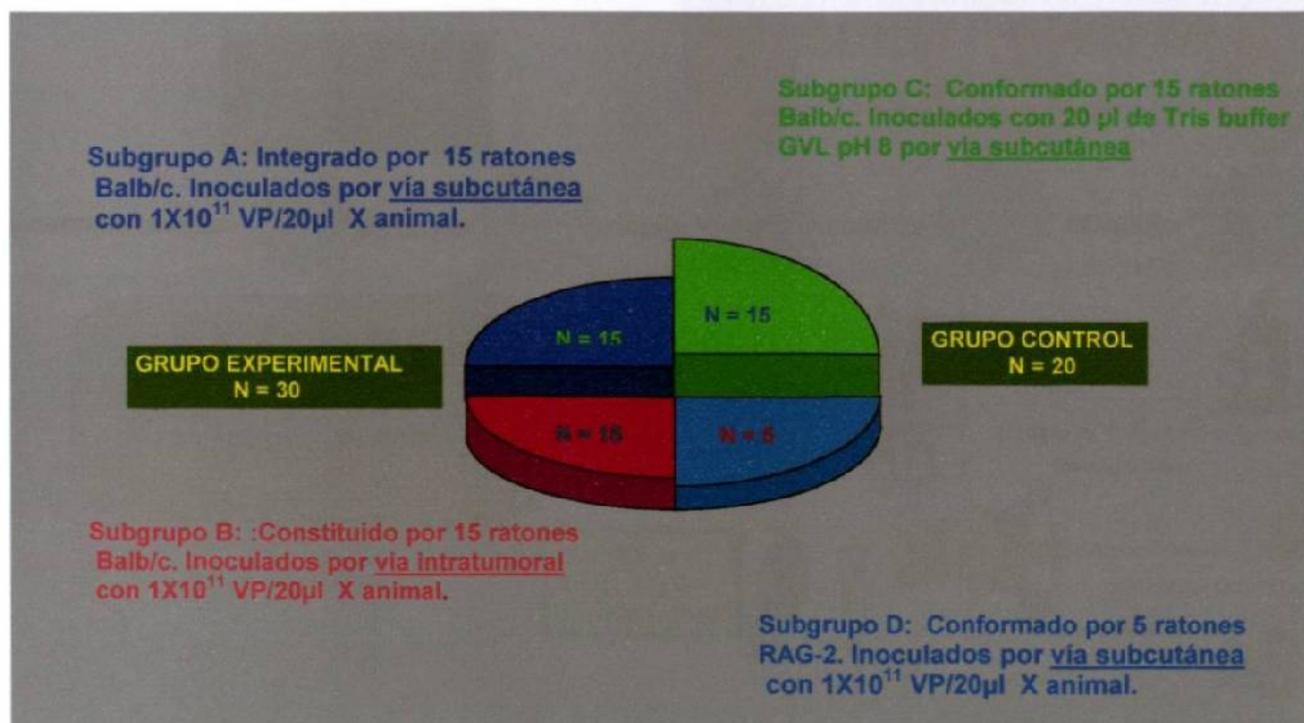


Figura 15. Diseño experimental de la primera etapa de investigación. La población en estudio quedó constituida por 50 ratones subdivididos en 4 grupos de estudio.

Dos semanas después de la inmunización (día 14), todos los animales fueron inoculados con un Segundo tipo de adenovirus portador de la secuencia codificante de luciferasa. La inyección se realizó directamente dentro del tejido tumoral a una dosificación de 1×10^{11} VP/20 μ l.

Dos, siete y catorce días después de la reinmunización (días 16, 21 y 28) se sacrificaron 5 animales de cada grupo. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ovario, piel y tumores. Todos los órganos extraídos fueron examinados inmediatamente y de manera directa por medio de un microscopio de inmunofluorescencia para efectuar un análisis cualitativo de los niveles de fluorescencia presentes en cada una de las muestras biológicas. Posteriormente, se realizó el ensayo de luciferasa con el propósito de determinar de manera cuantitativa los niveles de expresión de los genes reporteros

Antes, durante y al final del experimento se tomaron muestras de sangre de cada animal (días 0, 14, 16, 21 y 28) con la finalidad de establecer los niveles de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus; mediante los ensayos de ELISA y de anticuerpos neutralizantes. Los detalles metodológicos de la primera etapa de investigación son esquematizados en la **Figura 16**.

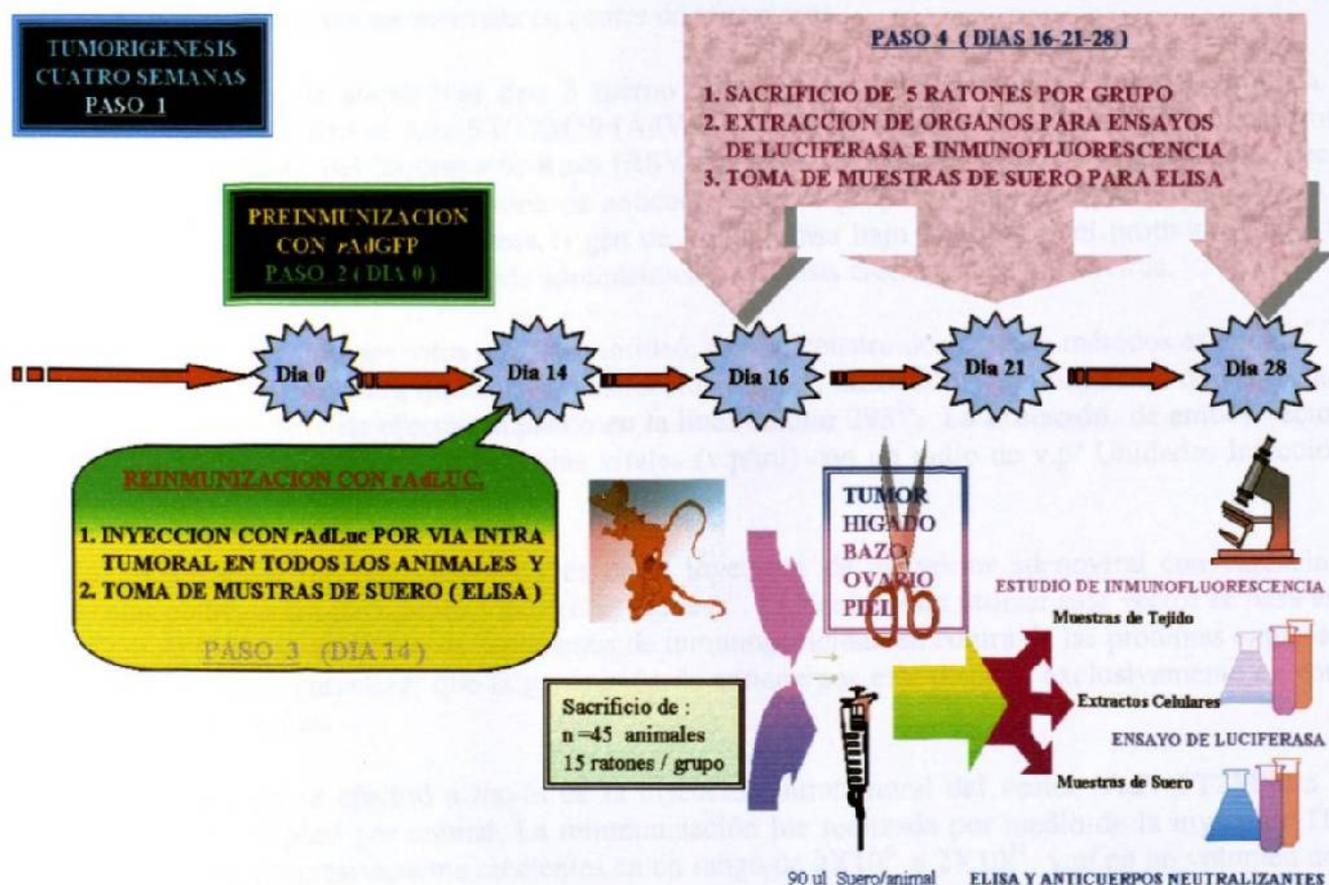


Figura 16. Estrategia general de la fase I. Representación esquemática del diseño experimental dirigido a evaluar el efecto de la inmunidad humoral sobre la expresión de los genes reporteros.

7.2.12 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA SEGUNDA ETAPA

El diseño experimental de la segunda etapa, se basa en una innovadora estrategia consistente en utilizar dosis crecientes (masivas) de vectores adenovirales en ratones pre-inmunizados, a los cuales se les ha inducido la generación de tumores mamarios de tipo heterotópico. Dos semanas después de la administración inicial del vector, los animales son reinoculados con un segundo tipo de adenovirus por medio de una inyección intratumoral. El propósito general de esta estrategia es determinar los efectos de la pre-inmunización sobre la transducción intratumoral y la diseminación sistémica de AdV-Luc. y dilucidar, si la utilización de dosis crecientes de vectores adenovirales en ratones con inmunidad pre-existente puede superar los efectos de la inmunidad local pero no los de la neutralización sistémica, restituyéndose así los niveles de expresión; sin la presentación de fenómenos de hepatotoxicidad o diseminación sistémica.

En este singular modelo biológico, la presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus pudiera impedir su diseminación más allá del sitio de inyección, circunscribiendo la expresión del transgen al micro-ambiente tumoral. Desde esta perspectiva, la barrera de anticuerpos evitará la infección de las células hepáticas, así como, la presentación de inflamación y la consiguiente destrucción de los hepatocitos por los linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, dentro del parénquima tumoral la pobre vascularización del tumor en conjunto con una población excesiva de partículas virales, rebasarán el umbral de la respuesta inmune montada en contra de adenovirus.

Dos diferentes tipos de adenovirus tipo 5 fueron utilizados durante esta etapa. Durante la etapa de preinmunización se utilizó el Adv-5 FT2M59 (AdV-FT2M59) construido bajo el control transcripcional del promotor del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) y carente de genes reporteros (gutless), este vector fue utilizado para inducir la producción de anticuerpos en el grupo de animales pre-inmunizados. Un segundo vector (AdV-Luc) que expresa el gen de la luciferasa bajo el control del promotor CMV fue utilizado durante la re-inmunización y/o administración de dosis crecientes de adenovirus.

Ambos vectores han sido descritos con anterioridad, fueron construidos con los métodos estándar.^{5,32,78} Su titulación fue determinada mediante espectrofotometría de absorción y la utilización de las técnicas de diluciones seriadas y de efecto citopático en la línea celular 293²⁸. La titulación de ambos vectores se ubicó en el rango de 9×10^{12} partículas virales (v.p/ml) con un radio de v.p/ Unidades Infecciosas menor de 20.

La preinmunización fue realizada a través de la inyección de un vector adenoviral con carencia de secuencias codificantes para genes reporteros "Gutless". La decisión de utilizar este vector se basa en la necesidad de evitar la aparición de fenómenos de inmunogenicidad en contra de las proteínas expresadas por los transgenes y garantizar que la generación de anticuerpos esté dirigida exclusivamente en contra de los antígenos virales.

La preinmunización se efectuó a través de la inyección intratumoral del vector AdV-FT2M59 a una dosis de 1×10^{11} v.p/ml por animal. La reinmunización fue realizada por medio de la inyección IT de AdV-Luc a dosis progresivamente crecientes en un rango de 2×10^9 a 2×10^{11} v.p/ en un volumen de 20 μ l/ tumor. Los aspectos metodológicos relacionados con el modelo tumoral, animales, ensayos in vitro, líneas celulares, recolección de tejidos, toma de muestras de suero, análisis enzimáticos, estudios histológicos y análisis estadístico han sido descritos previamente dentro del capítulo 7 de Material y Métodos.