

**TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES: ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS****OSVALDO L. PODHAJECER<sup>1</sup>, DAVID GOULD<sup>2</sup> y YUTI CHERNAJOVSKY<sup>2</sup>***<sup>1</sup>Instituto Leloir-CONICET-FCEYN (UBA) y <sup>2</sup>Bone and Joint Research Unit, University of London*

Los ensayos clínicos con terapias biológicas que utilizan anticuerpos y citoquinas se han incrementado en los últimos años para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinmune. Sin embargo estos tratamientos poseen varias limitaciones, a saber, el costo del tratamiento, la necesidad de administraciones frecuentes de la medicación y los efectos colaterales adversos. Estas limitaciones pueden ser superadas mediante el uso de terapia génica. La terapia génica somática consiste en la introducción de nuevo material genético en las células de un individuo con objetivos terapéuticos. Inicialmente pensada para abordar el tratamiento de enfermedades hereditarias monogénicas, los últimos años han sido testigos de

un gran incremento en el número de trabajos dedicados al uso de terapia génica en enfermedades poligénicas adquiridas como las enfermedades autoinmunes. Esta presentación se basa en una actualización del estado del arte de la aplicación de esta disciplina a las enfermedades autoinmunes, incluyendo el nivel de sofisticación y variedad de procedimientos que están siendo utilizados en el mundo, además del diseño de moléculas y vectores terapéuticos, la modificación genética de células y la regulación de la expresión genética para aumentar la especificidad de la respuesta. La mayor parte de los estudios a presentar estarán basados en la experiencia obtenida en esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y diabetes tipo I.

**PROPIEDADES ANTIPROLIFERATIVAS DE LA PROTEINA HERPÉTICA ICP0, EXPRESADA A PARTIR DE VECTORES HERPÉTICOS DE TIPO AMPLICÓN****ALBERTO L. EPSTEIN***CGMC, CNRS – UMR 5534, Université Claude Bernard, Lyon – France.*

La identificación de proteínas con actividad citostática o citotóxica es un hito importante en el desarrollo de nuevas herramientas de lucha contra el cáncer. Una proteína de regulación del virus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1), conocida como ICP0, presenta dichas propiedades, dado que induce efectos citostáticos y citotóxicos en células infectadas por HSV-1 o transfectadas con plásmidos que la expresan. Para investigar si ICP0 puede impedir la proliferación de células cancerosas, construimos vectores herpéticos de tipo amplícón que expresan ICP0, o formas mutadas de ICP0, y la proteína marcadora GFP. Estos vectores se utilizaron para infectar células cancerosas o células primarias quiescentes, y evaluar el impacto de ICP0 sobre la proliferación y la viabilidad celulares, así como la interacción de ICP0 con ciertas proteínas celulares implicadas en la proliferación. Nuestros

resultados muestran que ICP0 impide la proliferación de dos líneas de células cancerosas humanas (glioblastoma Gli36 y hepatoma Huh7). La expresión de ICP0 en las células Gli36 induce además, aproximadamente 50 % de muerte celular, 3 días luego de la infección. No vimos efectos tóxicos significativos en células Huh7, posiblemente debido al bajo nivel de acumulación de ICP0 o a la menor tasa de proliferación de estas células. Las células Gli36 moribundas no muestran cambios de marcación con Anexina V, ni muestran activación de Caspasa 3, lo que sugiere que no están entrando en apoptosis. En cambio, la liberación de lactato-deshidrogenasa sugiere muerte de tipo necrótico. ICP0 no induce efecto tóxico alguno en cultivos de células primarias cardíacas o nerviosas de rata, dos modelos bien caracterizados de células no proliferativas.

Gracias al empleo de anticuerpos específicos contra ICP0, y contra las proteínas PML (ProMyelocytic Leukemia), y centromérica CENP-A, observamos que ICP0 expresada desde el vector amplicón colocaliza tanto con PML como con CENP-A, inmediatamente luego de la infección. Unas horas más tarde ICP0 induce la desorganización de los cuerpos nucleares PML y la degradación de CENP-A, en ambos tipos de células cancerosas. Ninguno de estos efectos fue observado en células infectadas con vectores que expresan sólo GFP o una pro-

teína ICP0 mutada. Por microscopía confocal hemos observado que la forma salvaje de ICP0 induce la formación de micronúcleos y otras aberraciones nucleares en las células Gli36 y Huh7. La acción citostática y citotóxica de ICP0 es directa, y no necesita de prodrogas. Estos efectos, así como la ausencia de toxicidad en células primarias quiescentes, sugiere que ICP0 puede ser el primer miembro de una nueva familia de proteínas, capaces de actuar de modo directo, que podrían ser utilizadas como armas eficaces en la lucha contra el cáncer.

## EXPERIENCIA CLÍNICA EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES HEPÁTICOS AVANZADOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA Y CELULAR

**GUILLERMO MAZZOLINI\***

*Unidad de Hepatología y Terapia Génica. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona. España.*

*\*Filiación actual: Unidad de Hepatología. Hospital Universitario Austral. Facultad de Cs. Biomédicas. Universidad Austral. Buenos Aires Argentina.*

Numerosas enfermedades del hígado adolecen de un tratamiento satisfactorio lo cual justifica la búsqueda de alternativas terapéuticas. La terapia génica surge como una nueva modalidad para el tratamiento de enfermedades hereditarias y adquiridas y se basa en la transferencia de material genético al interior de las células diana para ejercer un efecto biológico. Este material genético debe ser incorporado en vectores con el fin de facilitar su entrada a las células y permitir su expresión. Los vectores se construyen sobre la base de estructuras moleculares de origen no viral o viral, siendo los últimos los más empleados por su elevada eficiencia de transducción. Tanto el tipo de vector como el cassette de expresión determinan la duración, especificidad y la inducibilidad de la expresión génica. Para el tratamiento de los tumores hepáticos avanzados se han empleado diversas estrategias tales como la transferencia génica de citocinas inmunoestimuladoras (como la interleukina-12); inmunoterapia con células dendríticas modificadas genéticamente; transferencia de genes suicidas para inducir una «quimioterapia molecular», antiangiogenesis, etc.

Si bien el desarrollo clínico de la terapia génica ha sido importante en los últimos años, con más de 600 ensayos clínicos puestos en marcha en el mundo, la información disponible sobre biodistribución, duración o eficiencia de la expresión de los diversos sistemas de transferencia génica es escasa o nula. La capacidad de evaluar la transferencia de genes a los tejidos se limita actualmente al estudio de muestras obtenidas por métodos invasivos (biopsias). Estos parámetros inciertos pueden ser cruciales al momento de conocer o predecir el

comportamiento del vector administrado. El desarrollo de un método no invasivo aplicable a humanos que permitiera determinar *in vivo* de manera simple y repetida la localización y magnitud de la expresión génica es hoy día una necesidad. En la búsqueda de aproximaciones que permitan visualizar la expresión génica *in vivo* se han desarrollado sistemas que cuantifican la expresión de genes mediante tomografía de emisión de positrones (PET). Entre ellas se encuentra la transferencia a las células tumorales del gen de la timidina kinasa (tk) del virus del herpes simple tipo 1 (HSV), que posee una alta afinidad por distintos análogos de nucleósidos. La producción por las células del tumor de la enzima viral permite en ellas la fosforilación selectiva del análogo, que interfiere entonces con la síntesis del ADN y conduce a la muerte celular. Esta aproximación terapéutica se ha mostrado efectiva en el tratamiento de modelos experimentales tumorales y ha dado lugar a la puesta en marcha de ensayos clínicos en diferentes neoplasias. La visualización de la transferencia génica del gen de la tk del HSV con PET se fundamenta en la utilización como sonda de imagen de la misma tk que produce el efecto terapéutico. De esta manera la administración sistémica de un análogo fluorado del ganciclovir (como el penciclovir fluorado) que es fosforilado de manera selectiva por la tk conlleva a un atrapamiento celular del mismo, permitiendo la visualización externa y su cuantificación. De esta manera, en los sitios del organismo donde existe emisión de fotones es donde se encuentra también el gen de la tk. Con la administración de pequeñas cantidades del radiofármaco sería posible conocer la biodistribución

del vector administrado, y de esta manera las señales *in vivo* captadas por la PET pueden relacionarse de manera cuantitativa con el nivel de expresión génica.

Hemos explorado clínicamente algunas de las estrategias de terapia génica en el contexto de pacien-

tes con tumores hepáticos avanzados y aquí se expondrán los resultados obtenidos. También se comentarán las primeras experiencias en la monitorización *in vivo* de la expresión génica mediante PET en pacientes.

## ANGIOMIOGÉNESIS TERAPÉUTICA POR TERAPIA GÉNICA

**ALBERTO J. CROTTOGINI**

*Departamento de Fisiología, Universidad Favaloro*

La angiogénesis terapéutica reconoce actualmente tres abordajes: 1) la inyección directa de factores de crecimiento; 2) la transfección con genes que codifican para citoquinas angiogénicas, y 3) el uso de células pluripotentes que, implantadas en el territorio isquémico, adquieran un fenotipo vascular o actúen parácrinamente segregando sustancias angiogénicas. Otro desafío importante en el momento actual es la miocardiogénesis terapéutica para tratamiento de la pérdida de masa miocárdica contráctil. En este campo, el enfoque unánime es el implante de células precursoras o de mioblastos de músculo esquelético.

Con el objeto de evaluar la eficacia angiogénica de un plásmido codificante para VEGF 165 (pVEGF) en la enfermedad coronaria crónica, inyectamos pVEGF o plásmido vacío (placebo) en el miocardio del ventrículo izquierdo (VI) de cerdos con isquemia crónica de cara anterior de VI inducida por oclusión progresiva de la arteria circunfleja. Los cerdos tratados evidenciaron una mejoría significativa en la perfusión de la zona isquémica durante el estrés, y la presencia de vasos pequeños con capa muscular lisa (arteriolas) en número y longitud significativamente mayores que los cerdos placebo. Este efecto arteriogénico del pVEGF se suma al conocido poder mitogénico del VEGF sobre células endoteliales.

Como resultado inesperado, se observó en los cerdos transfectados un aumento muy significativo del índi-

ce mitótico de miocardiocitos adultos e hiperplasia miocardiocítica que sugieren que el VEGF tendría un efecto mitogénico más pleomórfico que el que originalmente se le atribuyó. Esto nos alentó a poner a prueba la hipótesis de que la transfección con pVEGF reduciría el tamaño de un infarto de miocardio experimental, cosa que hicimos en un grupo de ovejas con ligadura aguda de la arteria descendente anterior. Los animales transfectados tuvieron, a los 15 días de la oclusión, un área necrótica significativamente menor que los placebo. Los mecanismos involucrados fueron, secuencialmente, una respuesta inicial angiogénica, antifibrogénesis en la zona periinfarto, proliferación mioblástica y aumento del índice mitótico de miocardiocitos adultos. Incluso observamos imágenes de citoquinesis miocardiocítica. Recientemente hemos comprobado que este efecto limitador del tamaño de infarto se mantiene a 60 días de la oclusión coronaria. Estos resultados nos inducen a pensar que el VEGF tendría un rol que cumplir en la miocardiogénesis terapéutica, y que este efecto sería fisiológicamente más razonable que el del implante de células precursoras, ya que al actuar induciendo la replicación celular, quedaría garantizada la conexión eléctrica y contráctil entre el miocardio preexistente y el nuevo, cosa que aún no ha podido ser demostrada en la miocardiogénesis por implante celular.