

Terapia genética para la infección por VIH

Genetic therapy for HIV infection.

CHINEN Javier*

*Médico Cirujano, Universidad Peruana Cayetano Heredia; PhD. en Inmunología, Baylor Collage of Medicine. Houston, Texas, Estados Unidos de Norteamérica.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), producido por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ha adquirido características de pandemia y es motivo de preocupación mundial. En el Perú, se han diagnosticado mas de 4,500 casos de SIDA y se calcula que alrededor de cincuenta mil personas están infectadas con el VIH. De estos últimos, aproximadamente el 75% desarrollarán la enfermedad en los próximos cinco años. Más de veinte millones de personas están infectadas alrededor del mundo, siendo mujeres y niños las poblaciones cuyas tasas de infección están aumentando con mayor rapidez (1,2). La biología molecular del virus ha sido bastante estudiada. La secuencia genética del virus y la variedad de proteínas virales que son sintetizadas son conocidas, así como la regulación de la replicación viral. Desafortunadamente, la terapia anti-VIH está lejos de ser óptima. Las actuales combinaciones de drogas anti-VIH retardan la progresión de la enfermedad y la aparición del SIDA, pero el efecto a largo plazo no es claro. Zidovudina, la primera droga anti-VIH que demostró reducir la concentración de virus en plasma y la recuperación de los linfocitos T, así como inducir una aparente mejoría clínica en los paciente, no demostró poder reducir la mortalidad por SIDA (3). Nuevas drogas anti -VIH están siendo probadas con diferentes protocolos de tratamiento; sin embargo, la posibilidad de desarrollo de resistencia a estos medicamentos es aún alta, debido a que el virus muta con una frecuencia extraordinaria. Además los efectos adversos son bastantes severos y frecuentes. Muchos pacientes no toleran estos efectos y no pueden cumplir con el esquema de tratamiento (4).

Además de las medidas de prevención, es necesario el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias terapéuticas para la infección por VIH. Nuevos enfoques biológicos para el tratamiento de la infección por VIH han sido propuestos, y entre ellos está el uso de la terapia genética. La infección por VIH puede ser considerada una enfermedad genética adquirida, pues el virus se integra dentro del genoma de la célula infectada, se replica con ella y tiene el potencial de expresarse hasta que la célula muere. El virus se transmite verticalmente de madre a hijos y la persona infectada se convierte en mosaico para los genes del VIH. En forma general, la terapia genética puede definirse como la hematopoyéticas del paciente, translucirlas con el gen protector y reinfundirlas al paciente,

esperando regenerar la población de las células del sistema inmune con células protegidas contra la replicación del VIH. Sin embargo, este sistema tiene aún importantes limitaciones: la eficiencia de transducción es relativamente baja y se requiere que la célula a transducir esté dividiéndose. Varios grupos están trabajando intensamente para reducir estas limitaciones, probando diferentes métodos de transducción con la ayuda de diferentes citoquinas y ensayando nuevos vectores retrovirales que se integren en el genoma celular sin necesidad de que la célula se esté dividiendo.

El gen terapéutico ideal debe ser efectivo, no tóxico y activo contra diferentes cepas de VIH. Algunos genes que han sido ensayados con éxito son: los transdominantes negativos de las proteínas virales Tat, Tev, Gag y Env; TAR y RRE, moléculas ARN anti-sentido y ribozimas (6). Al momento, los resultados son optimistas y cuatro de estas estrategias han sido aprobadas para ensayos clínicos en los Estados Unidos. Los resultados de uno de estos estudios han sido publicados. Woffedin et al. ha demostrado una ventaja de supervivencia de células T periféricas que expresan un transdominante negativo de Rev, en pacientes infectados con VIH (7).

A falta de modelos animales satisfactorios, estos genes inhibidores de la replicación del VIH son ensayados básicamente en el laboratorio, transfiriendo los genes protectores a linfocitos de donantes e infectándolos luego con diferentes cepas de VIH. La inhibición de la replicación viral en estos cultivos, y la supervivencia de los linfocitos a la infección son los indicadores que miden la efectividad de un gen candidato. Adicionalmente, se realizan ensayos transluciendo células hematopoyéticas y midiendo la protección anti-viral en las células diferenciadas.

Estrategias para la terapia genética anti VIH (Tabla N°1)

Tabla N°1. Principales estrategias para la terapia genética anti-VIH.

BASADAS EN ARN	BASADAS EN PROTEINAS
- Antisentido	- Proteinas transdominantes
Gag	Tat
TAR	Rev
Rev	Gag
LTR	Env
- Ribozimas	- Toxina diftérica
Tipo cabeza de martillo:	- Anticuerpos de cadena única
Nef	gp120
Tat	Transcriptasa reversa
Rev	Tat
Tipo Hairpin:	Rev
Pol	
Secuencia 5' lider	
- Señuelos de ARN	
TAR	
RRE	

A) Estrategias basadas en ARN:

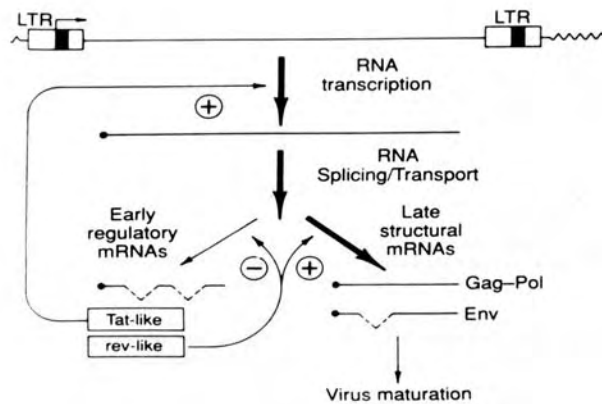
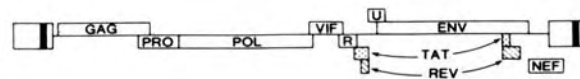
Este grupo incluye las secuencias anti-sentido, las ribozimas y los señuelos (decoys) de ARN. Las posibles ventajas en estas estrategias son: menor probabilidad de inmunogenicidad, mayor facilidad de expresión a altos niveles y no ser específico para

determinada cepa de HIV. Algunos problemas asociados con estas estrategias son la dificultad de colocación de ribozima con la secuencia contra la cual está dirigida, la baja estabilidad de las moléculas de ARN y la posibilidad de resistencia temprana, pues la mutación de una sola base en la secuencia del virus puede alterar la cinética de la unión con la secuencia de ARN (8).

I. ARN anti-sentido. Estas moléculas se unen a las secuencias de ARN virales para bloquear la traducción de los mensajes o promover su degradación. Chatterjee et al. estudió una molécula antisentido dirigida al promotor del VIH, utilizando adeno-asociados como vector. Ellos demostraron una reducción en la expresión de la actividad del promotor de VIH y una reducción de los títulos virales (9). Otros han acoplado estas moléculas anti-sentido con compuestos que inhiben la polimerización de ácidos nucleicos, obteniendo también una disminución de la replicación viral (10) introducción de genes dentro del genoma de una célula, con el propósito de modificar su fenotipo de manera que alivie una determinada enfermedad. El uso de la terapia genética para infecciónes virales, llamadas también “inmunización intracelular”, se basa en la transferencia de genes (transducción) para inhibir la replicación viral dentro de la célula, previniendo la diseminación del virus.

VII. Organización y ciclo celular

Como todos los retrovirus, el VIH es un virus ARN de una sola hebra que presenta en cada extremo las repeticiones terminales largas (LTR), y tres genes estructurales: gag, que codifica un precursor poliproteico, pol, que codifica tres enzimas virales: proteasa, transcriptasa reversa e integrasa; y env, que codifica glicoproteínas de membrana. El VIH es también un retrovirus complejo que, además de los genes estructurales, expresa seis genes que regular la replicación viral (Figura N°1).



El ciclo celular del VIH comienza con la unión de la proteína viral gp 120 al receptor CD4 en la membrana de los linfocitos T. Otras proteínas de membrana pertenecientes al grupo de quemokinas C-C han sido reportadas recientemente como cofactores esenciales para la infección. Después de la entrada del virus, la transcriptasa reversa asociada al virus transcribe el ARN genómico viral y produce ADN viral de doble hebra, el cual es transportado hacia el núcleo. La integrasa viral permite la integración del ADN viral en el genoma de la célula. La expresión de los genes virales es iniciada por el promotor del VIH y es aumentada por factores de transcripción celular, los cuales están desafortunadamente también asociados a los procesos de activación de los linfocitos T. Así cada vez que los linfocitos T infectados se activan, la transcripción del virus es también activada. Los genes reguladores tat y rev son los primeros en ser expresados, y son necesarios para modular la síntesis de ARN mensajero. La proteína Tat aumenta la transcripción del genoma viral en 10,000 veces. La proteína REv es esencial para la expresión de proteínas estructurales necesarias para las etapas finales de la replicación viral: el ensamblaje, la maduración y la salida de las partículas virales (Figura N°1b).

Terapia genética para la infección por VIH

En la infección por VIH, la terapia genética está siendo aplicada para generar linfocitos capaces de inhibir la replicación del virus. El VIH infecta primordialmente linfocitos CD-4 positivos y monocitos, en consecuencia, un gen terapéutico debe ser transducido a estas células CD-4 positivas, a monocitos o a células hematopoyéticas pluripotenciales. Si se consigue conferir la protección anti-VIH a las células hematopoyéticas, las células que se diferencien de ella estarán protegidas y así esta protección se mantendrá de por vida. El vector de genes más apropiado para transducir células hematopoyéticas es el retrovirus murino, porque existe ya gran experiencia para la transducción de células hematopoyéticas y porque la integración del gen transducido es permanente (5). Así, el plan de tratamiento consistiría en obtener células.

II.- Ribozimas catalíticas. Las ribozimas son moléculas de ARN anti-sentido con actividad enzimática adicional que escinde secuencias de ARN específicas. Un gen ribozima del tipo “hairpin” (horquilla) fue transducido a células T y a células hematopoyéticas de cordón umbilical (11). Se encontró resistencia de las células T y de los macrófagos derivados de células hematopoyéticas contra la infección de diferentes cepas de VIH. Un tipo diferente de ribozima, denominado “cabeza de martillo” por su estructura, ha sido también exitosamente ensayado “in vitro”, teniendo como objetivo los genes reguladores tat, rev y nef2 (12).

III. Señuelos de ARN. Esta estrategia utiliza las secuencias ARN de TAR o RRE para secuestrar las proteínas virales Tat o Rev y prevenir sus efectos en transcripción del VIH. TAR se une fuertemente a Tat y RRE se une a Rev. Lisziewics et al. Han logrado inhibir la actividad de Tat en ensayos de transfección temporal, utilizando un plásmido que llevaba 50 copias de TAR en serie (13). Una combinación de TAR y ribozima, en un solo vector, transducidos a células Molt3 T y a células monocucleares demostró poder inhibir la replicación del VIH. Los estudios utilizados la secuencia del RRE también han dado resultados similares. Los posibles problemas con los señuelos de ARN incluyen la necesidad de niveles altos de expresión y la unión de factores celulares que pudieran ser

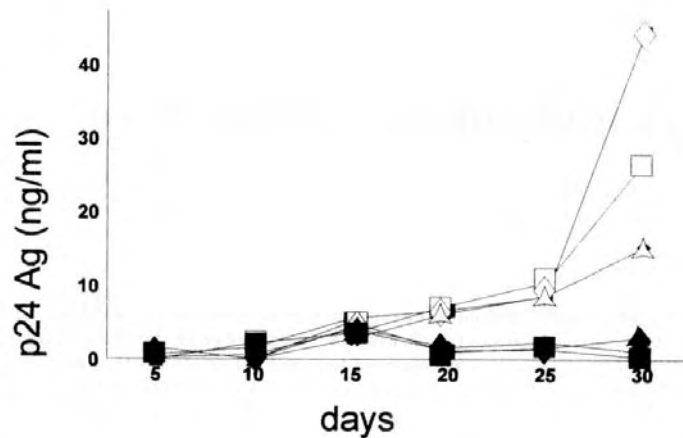
esenciales par la función celular normal, pues ambos, TAR y RRE han demostrado alta afinidad por proteínas celulares(8).

B) Estrategia basadas en proteínas. Los enfoques utilizando proteínas del VIH mutadas son diseñadas para competir con proteínas virales normales e interferir con su función. Sus efectos son evidentes luego de la integración viral en el genoma de la célula huésped, inhibiendo la producción de proteínas, la replicación y la diseminación del virus. La mayor desventaja que ha sido propuesta para estos enfoques es la posibilidad de una respuesta para estos enfoques es la posibilidad de una respuesta inmune contra las células transducidas con la secuencia terapéutica. Aún no hay evidencia definitiva que de respuesta a esta interrogante (8).

I. Proteínas estructurales: Una mutante de la proteína Gag fue diseñada para interferir con la multimerización de las proteínas derivadas de GAg y el embalaje de un virion VIH maduro. Se demostró que esta mutante podía interferir con la producción del virus, pero era menos potente que TAR o que el Tat anti-sentido. En otro estudio, la diseminación viral y los efectos citopáticos fueron inhibidos en células T transducidas con un gen mutante de la proteína Env, cuya expresión era dependiente de Tat (14,15).

II. Proteínas reguladoras: Malim et al. han descrito un gen transdominante de Rev (Rev M 10), con mutaciones en una región conservada que es abundante en leucina. Rev M 10 retiene el sitio de unión del RRE y las propiedades multimerizantes de Rev, pero actúa como transdominante inhibidor de la proteína Rev normal en ensayos de transfección temporal (16). Grupos diferentes han demostrado que las células T transducidas con transdominantes de Rev son resistentes a la infección por VIH. Una proteína transdominante de Tat, 52/57 Tat, con mutaciones en la secuencia de localización nuclear, también ha demostrado actividad inhibitoria en ensayos temporales probablemente secuestrando factores celulares importantes para la transactivación por Tat. Sin embargo, la inhibición de Tat no es un efecto duradero, aparentemente debido a la capacidad del virus de poder replicarse en ausencia de Tat. Los mecanismos propuestos para la acción de los transdominantes de Tat y Rev son la multimerización con la proteína viral normal, impidiendo su función, el secuestro de proteínas celulares que intervienen en la función de la proteína viral y la competencia por sitios de ARN específicos para la proteína.

Nosotros hemos producido una proteína anti VIH, llamada Trev, mediante la unión de un transdominante de Tat con otro de Rev, logrando una proteína recombinante con doble efecto inhibidor. De esta manera creemos que se logra una mayor efectividad en supresión de la replicación viral, pues conocemos que la inhibición de Tat no es suficiente para un efecto a largo plazo y la inhibición de Rev puede llevar a la mayor producción de ARN mensajeros de Tat y Tev normales, que producirían una retroalimentación positiva y anularía el efecto inhibidor. Los ensayos in vitro han sido exitosos, demostrando que Trev inhibe la replicación del VIH tanto en líneas celulares de linfocitos T como en linfocitos frescos de donantes voluntarios normales (Figura N°2).



Otras estrategias anti-HIV que actualmente están siendo ensayadas son: la toxina diftérica como gen suicida, la expresión intracelular de Interferon y los anticuerpos de cadena única contra diversas proteínas virales, expresadas intracelularmente.

Conclusiones y Posibilidades Futuras

El objetivo de la terapia genética anti-VIH es producir un sistema inmune con células resistentes a la replicación viral, que a la vez sean funcionales y combatan las infecciones por otros organismos.

A diferencia de las enfermedades genéticas, en las cuales la terapia genética interviene para reemplazar un gen defectuoso, y cuyos principales problemas son la transferencia y la apropiada regulación del gen, las estrategias de terapia genética para controlar la infección por VIH y otras infecciones enfrentan variables adicionales producidas por la biología de la interacción entre el virus y nuestro cuerpo. Aún no es claro cuál es el principal mecanismo por el que el VIH conduce a la depleción de los linfocitos T y al SIDA. ¿Es un efecto directo citopático? o son efectos indirectos como autoinmunidad y apoptosis inducidas por las proteínas virales?. Aún si la terapia genética para el VIH no tiene el efecto terapéutico esperado, su utilización permitirá obtener datos que nos permitan definir mejor la patogénesis de la enfermedad, pues esta estrategia protegerá absolutamente contra el efecto citopático, pero no contra los efectos indirectos del virus. Estos últimos sólo serán disminuidos parcialmente con una reducción de la carga viral.

Las estrategias de terapia genética para la infección por VIH son bastante promisorias. Estudios de la cinética de replicación viral señalan que una reducción de la tasa de replicación viral tan pequeña como 100 veces sería suficiente para que el sistema inmune pueda controlar la infección temprana (17). Varias de estas estrategias han sido ensayadas exitosamente en el laboratorio y esperan la aprobación de los organismos de control respectivos para proceder con los ensayos clínicos. Una de las críticas importantes es el costo de este tratamiento, que incluye una transfusión de células hematopoyéticas. Inicialmente, es poco probable que los tratamientos estén al alcance de pacientes sin recursos económicos.

debemos recordar que los protocolos de terapia genética están planeados para realizar en una sola sesión y que posiblemente no presenten ningún efecto secundario. En contraste, las drogas anti-VIH tradicionales, además de ser también de alto costo económico, deben recibirse de por vida, con los efectos adversos severos descritos. La comunidad científica biomédica espera ansiosamente los resultados de los ensayos clínicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. WHO-AIDS Global Data. *Wkly Epidemiol Rec* 1995, 70: 353-355.
2. Procetss-MINSA. Estadísticas. Ministerio de Salud del Peru; Agosto 1996.
3. Aboulker JP, Swart AM. Preliminary analysis of the Concorde trial. *Lancet* 1993; 341: 889-890.
4. Johnston MI, Hoth DF. Present status and future prospects for HIV therapies *Science* 1993; 260: 1286-1293.
5. Salmons B, Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 129-141.
6. Bridges SH, Sarver N. Gene therapy and immune restoration for HIV disease *Lancet* 1995; 345:427-433.
7. Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ. Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 2889-2894.
8. Dropoulic B, Jeang KT. Gene therapy for human immunodeficiency virus infection: genetic antiviral strategies and targets for intervention. *Hum Gene Ther* 1994; 5 : 927-939.
9. Chatterjee S, Johnson PR, Wong KK. Dual-target inhibition of HIV of HIV-1 in vitro by means of an adeno associated virus antisense vector. *Science* 1992; 258: 1485-1488.
10. Anazodo MI, Salomon H, Friesen AD, Wainberg MA, Wrigth JA. Antiviral activity and protection of cells against human immunodeficiency virus type-1 using an antisense oligonucleotide phosphorothioate complementary to the 5'LTR region of the viral genome. *Gene* 1995; 166: 227-232.
11. Yu M, Leavitt MC, Yamada O, et al. Intracelular immunization of human fetal cord blood stem cells with a ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad USA* 1995; 92: 699-703.
12. Zhou C, Cather IC, Larson GP, Zana JA, Rossi JJ, Kohn DB. Inhibition of HIV-1 in human T lymphocytes by retrovirally transduced anti tat an rev hammerhead ribozymes. *Gene* 1994, 149: 33-99.
13. Lisziewicz J, Sun D, Lisziewicz A, Gallo RC. Antitac gene therapy: a candidate for late stage AIDS patients. *Gene Ther* 1995; 2:218-222.
14. Lori F, Lisziewicz J, Smyte J, et al. Rapid protection against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication mediated by high efficiency non-retroviral delivery of genes interfering with HIV-1 tat and gag. *Gene Ther* 1994; 1: 27-31.
15. Buschacher GL, Freed EO, Panganiban AT. Cells induced to express a human immunodeficiency type 1 envelope gene mutant inhibit the spread of wild-type virus. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 391-397.

16. Bevec D, Dobrovnik M, Hauber J, Bohnlein E. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cell by retroviral mediated gene transfer of a dominant negative Rev transactivator. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 9870-9874.

17. Modesti N, García J, Debouck C, Peterlin M, Gaunor R. Transdominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. New Biol 1991; 3: 759-768.

Correspondencia:

Javier Chinen

Department of Pediatrics, Baylor Collage of Medicine. One Baylor Plaza, Huston TX 77030. Estados Unidos de Norteamérica.

e-mail: jc690761@bcm.tmc.edu

Agradecimientos:

A los Drs. Humberto Guerra, Pedro Legua y Luis Manuel Valdez, por sus amables comentarios para la preparación de este artículo.

Rev Med Hered 1997; 8: 72-77.