

# Terapia genética para la infección por VIH.

CHINEN Javier\*

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 más 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 pacientes, 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 hematopoyética del paciente, transducirlas con el gen protector y reinfundirlas al paciente, esperando regenerar la población de 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 éxitos son: los transdominantes negativos de las proteínas virales Tat, Rev, Gag y Env; TAR y RRE, moléculas ARN anti-sentido y ribozimas (6). Al momento, los resultados son optimistas y cuatro de estas estrate-

\* Médico Cirujano, Universidad Peruana Cayetano Heredia 1991; Ph.D. en Inmunología, Baylor College of Medicine 1996, Houston, Texas. Estados Unidos de Norteamérica.

gias han sido aprobadas para ensayos clínicos en los Estados Unidos. Los resultados de uno de estos estudios han sido publicados. Woffendin et al. ha demostrado una ventaja de sobrevida 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 sobrevida de los linfocitos a la infección son los indicadores que miden la efectividad de un gen candidato. Adicionalmente, se realizan ensayos transduciendo células hematopoyéticas y midiendo la protección anti-viral en las células diferenciadas.

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

a) Estrategias basadas en ARN:

Este grupo incluye las secuencias anti-sentido, las ribozimas y los señuelos (decoys) de ARN. Las posibles ventajas es 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 colocalización 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 anti-sentido 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 infecciones 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.

**VIH. 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 y 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 regulan 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

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

BASADAS EN ARN	BASADAS EN PROTEINAS
- Antisentido	- Proteínas 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' líder	
- Señuelos de ARN	
TAR	
RRE	

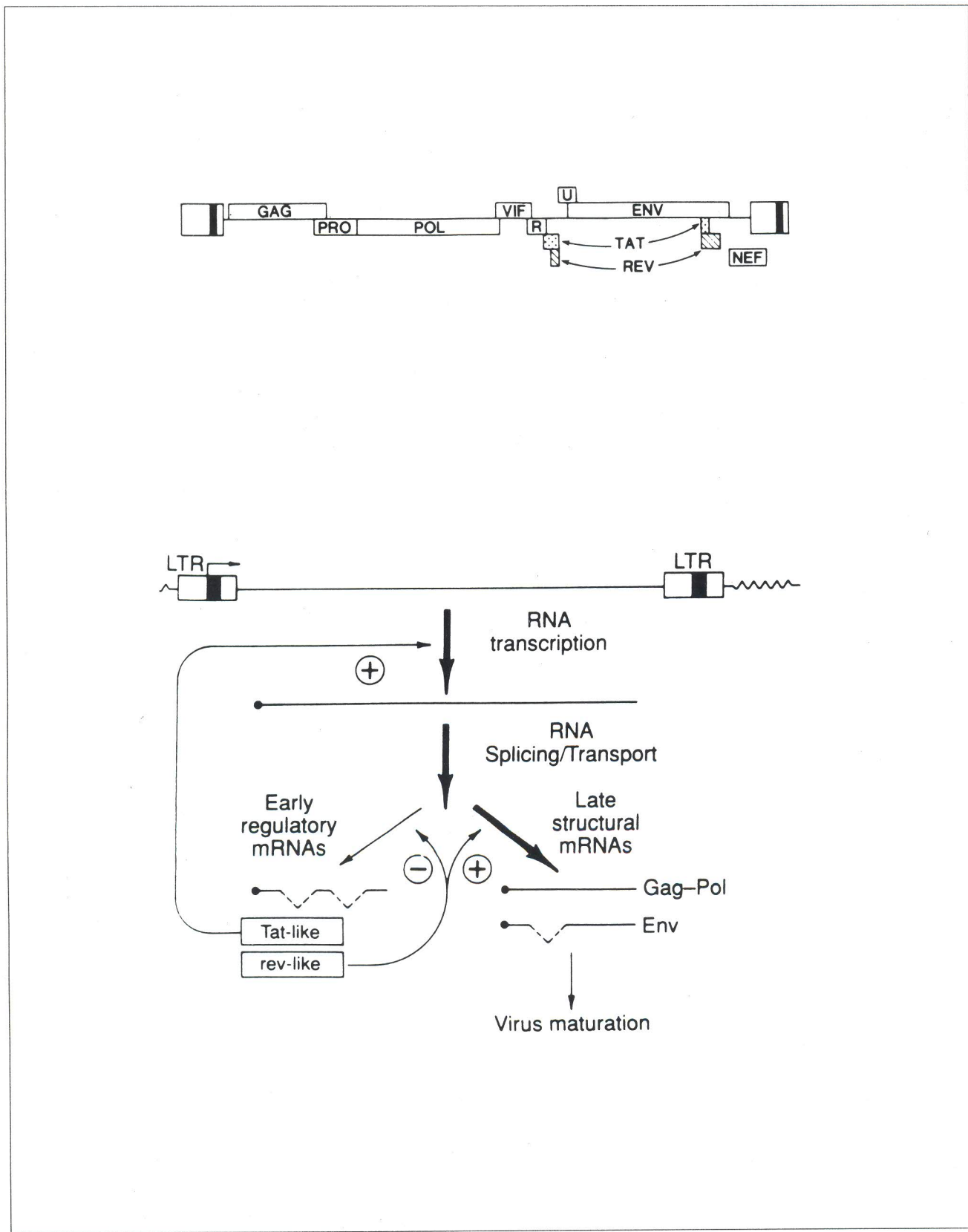


Figura N° 1.a. Organización genética del VIH. ViH produce diversas proteínas de acuerdo a los diferentes marcos de lectura ("open-reading frames") y sitios de escisión. Nef, Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu son proteínas reguladoras de la transcripción del genoma viral PRO, proteasa R, vpr. U, vpu. b. Regulación de la expresión viral por Tat y Rev. Tat estabiliza y aumenta los mensajeros de RNA. Rev permite la expresión de proteínas estructurales necesarias para la maduración del virus. (Tomado de Cullen BR: Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. Microbiol. Rev. 1992; 56: 375-394).

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 CD4-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 nef (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. Lisiewicz 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 mononucleares demostró poder inhibir la replicación del VIH. Los estudios utilizando 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 para 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 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 ensamblaje 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 (RevM10), con mutaciones en una región conservada que es abundante en leucina. Rev M10 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 la supresión de la replicación viral, pues conocemos que la inhibición de Tat no es suficiente para un efecto a largo plazo y la inhibi-

ción de Rev puede llevar a la mayor producción de ARN mensajeros de Tat y Rev normales, que producirían una retroalimentación positiva y anularían el efecto inhibitorio. 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 disminuídos parcialmente con la reducción de la carga viral.

Las estrategias de terapia genética para la infección por VIH son bastantes promisorias. Estudios de la cinética de replicación viral señalan que una reducción de la tasa de replicación viral tan pequeña como de 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 estos tratamientos estén al alcance de pacientes

sin recursos económicos estén al alcance de pacientes sin recursos económicos. Sin embargo, debemos recordar que los protocolos de terapia genética están planeados para realizarse 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.

#### **Correspondencia:**

Javier Chinen

Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston 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.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Who-AIDS Global Data. *Wkly Epidemiol Rec* 1995, 70: 353-355.
2. Procetss-MINSA. Estadísticas, Agosto 1996.
3. Aboulker JP and Swart AM. Preliminary analysis of the Concorde trial. *Lancet* 1993, 341: 889-890.
4. Johnston MI and Hoth DF. Present status and future prospects for HIV therapies *Science* 1993, 260: 1286-1293.
5. Salmons B and Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993, 4: 129-141.
6. Bridges SH and Sarver N. Gene therapy and immune restoration for HIV disease *Lancet* 1995, 345:427-433.
7. Woffendin C, Ranga U, Yang Z, XuL and 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 and 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 and 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 and Wright 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, Maruyama M Yong D, Ho AD, Wong-Staal F. Intracellular immunization of human fetal cord blood stem cells with a ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 699-703.
12. Zhou C, Cahner IC, Larson GP, Zana JA, Rossi JJ and Kohn DB. Inhibition of HIV-1 in human T lymphocytes by retrovirally transduced anti tat an rev hammerhead

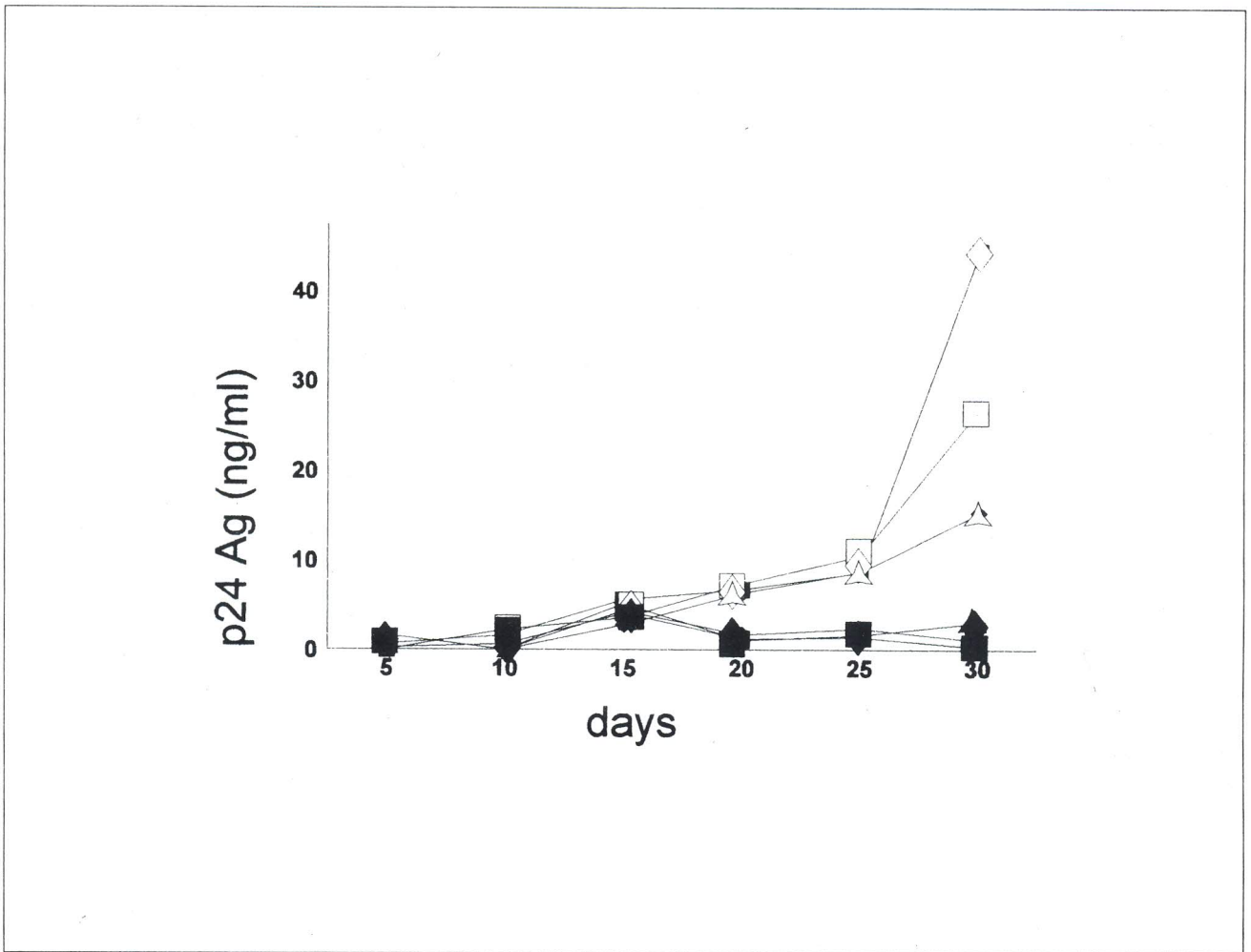


Figura Nº 2. Trev inhibe la replicación del VIH en linfocitos aislados de voluntarios normales. Los símbolos negros representan los cultivos de linfocitos transducidos con Trev. Los símbolos blancos representan los cultivos de linfocitos no transducidos. Se utilizaron diferentes múltiplos de infección (partículas virales de VIH/linfocitos): 0.002 (cuadrados), 0.004 (triángulos) y 0.02 (rombos).

ribozymes. *Gene* 1994, 149: 33-99.

13. Lisziewicz J, Sun D, Lisziewicz A and Gallo RC. Antitumor gene therapy: a candidate for late stage AIDS patients. *Gene Ther* 1995, 2: 218-222.
14. Lori F, Lisziewicz J, Smythe J, Cara A, Bunnag TA, Curiel D and Gallo RC. 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. Buchsacher GL, Freed EO, and Panganiban AT. Cells

induced to express a human immunodeficiency virus 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 and Bohnlein E. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells 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 and Gaunor R. Transdominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. *New Biol* 1991, 3: 759-768.