

LOS VECTORES VIRALES Y LA TRANSGÉNESIS

15
años

Martha Legorreta-Herrera¹
Francisco Martínez-Flores²
Fernando Hernández Sánchez³
Alejandro Zentella-Dehesa⁴

RESUMEN

Los vectores virales son el medio más eficiente para transferir genes, permiten modificar específicamente a una célula o a un tejido, para inducir la expresión de genes terapéuticos. Actualmente, se investigan diferentes virus que proporcionen la expresión permanente o temporal del transgene. Esos virus incluyen a los virus recombinantes, a los adenovirus, los virus adeno-asociados, los retrovirus y los virus herpes simplex. La elección del vector depende del uso y la eficiencia de la expresión del transgene, también se considera que su producción sea fácil, segura y estable.

En esta revisión se presenta: la biología de los virus, las bases de su manipulación genética y su potencial aplicación en modelos de transgénesis, algunos de estos factores podrían aportar elementos de juicio para la toma de decisiones prácticas y convenientes en procedimientos de transgénesis.

Palabras Claves: *Virus, vector, transgénesis, transfección.*

The viral vectors and the transgenesis

ABSTRACT

Viral vectors constitute the most efficient vehicles to transfer genes, they make possible to specifically modify cells or tissues to induce the expression of therapeutic genes. Actually, different virus to transduce permanent or temporarily transgenes are studied. Those virus include recombinant, adenoviruses, adeno associated virus, retrovirus, lentivirus and herpes virus. The vector selection depends on the efficiency and use of the transgen. It is also important to consider its easy, safe and stable production.

In this work, we present the biology of virus, the basis for its genetic manipulation and the potential application in transgenesis models. Some of these factors could be critical elements to take decisions on transgenesis procedures.

Key Words: *Virus, vectors, transgenesis, transfection.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 04 DE MAYO DEL 2012 Y ACEPTADO EL 18 DE MAYO DEL 2012.

1. INTRODUCCIÓN

La transgénesis se define como la introducción de ADN exógeno, en una célula eucarionte. A diferencia de la transferencia vertical de genes que ocurre en la reproducción (de padres a hijos), en la transgénesis la información se transmite de forma horizontal (directamente de un individuo a otro) por medio de procesos similares a una infección, con consecuencias biológicas como: mosaicismo, modificaciones en la dosis génica, inestabilidad del genoma, transferencia de mutaciones, etc. El desarrollo de

los métodos de transferencia de genes inició desde los años cincuentas, cuando se describió el ciclo lisogénico de los bacteriófagos cuyo genoma se integra establemente en la bacteria huésped y se replica junto con ella. La posterior descripción de elementos hereditarios no asociados con el cromosoma como los plásmidos, que en algunos casos se pueden insertar de forma estable en el genoma (episomal), posibilitó la transformación artificial de organismos unicelulares

¹Lab. de Inmunología Molecular, FES Zaragoza, UNAM. ²Depto. de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, ³Depto. de Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, ⁴Depto. de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. ¹E-mail: marthal@unam.mx.
MLH recibió financiamiento de DGAPA, PAPIIME PE200910.

y promovió la invención de métodos artificiales de transferencia de genes¹.

La transfección es la introducción de material genético externo en células eucariotas por medio de plásmidos, virus² u otras herramientas moleculares como la microinyección, la biobalística, los liposomas³, etc. (Figura 1). El problema de la transfección es la pluricelularidad porque la metodología es diferente si queremos modificar a todo el individuo o únicamente una parte. También es importante conocer si se requiere que los fenotipos adquiridos se hereden y tomar en consideración que no todas las células que contienen el mismo genoma responden al mismo método de transfección. Finalmente, la compartimentalización también afecta la expresión del gen de interés.

Entre los factores a considerar para un procedimiento óptimo de transfección en eucariontes están: el blanco, la ventana de tiempo, el nivel de expresión deseado, la estabilidad esperada, así como la factibilidad técnica. En este documento, se revisa la biología de los principales vectores víricos, las bases de su manipulación genética y su potencial aplicación en la transgénesis.

2. BIOLOGÍA DE LOS VIRUS

La palabra *virus* deriva del latín, que significa toxina o veneno.

Los virus son elementos genéticos con capacidad infectiva que se pueden replicar independientemente de los cromosomas de la célula que infectan. A diferencia de otros elementos genéticos como los plásmidos, el genoma viral puede ser ARN o ADN y está rodeado por una cubierta proteica o cápside. El conjunto de ácido nucleico y cápside se denomina nucleocápside o core del virus, el cual puede tener una envoltura. Cuando se encuentran en estado extracelular, a la partícula vírica se le denomina virión y esa es la estructura infectiva. Las proteínas asociadas al elemento genético (cápside, envoltura y proteínas reservorio encapsuladas) confieren un papel mucho más activo y menos azaroso durante la infección que depende del tropismo celular de cada virus, este es un fenómeno de interacción específica entre las proteínas de fijación de la superficie de la partícula vírica y los receptores de la membrana citoplasmática de la célula diana. Tras la fijación a la célula, la nucleocápside penetra en el interior del citoplasma, donde el ácido nucleico se libera de la cápside para migrar a los lugares de la biosíntesis celular. Cuando el genoma viral se introduce a una nueva célula se inicia la fase intracelular donde ocurre la replicación vírica.

La topología, el tamaño y la naturaleza del genoma viral influyen en el éxito y la especificidad de la infección y en consecuencia el potencial como herramienta de transferencia de genes. El ácido nucleico de los virus puede ser: monocatenario o

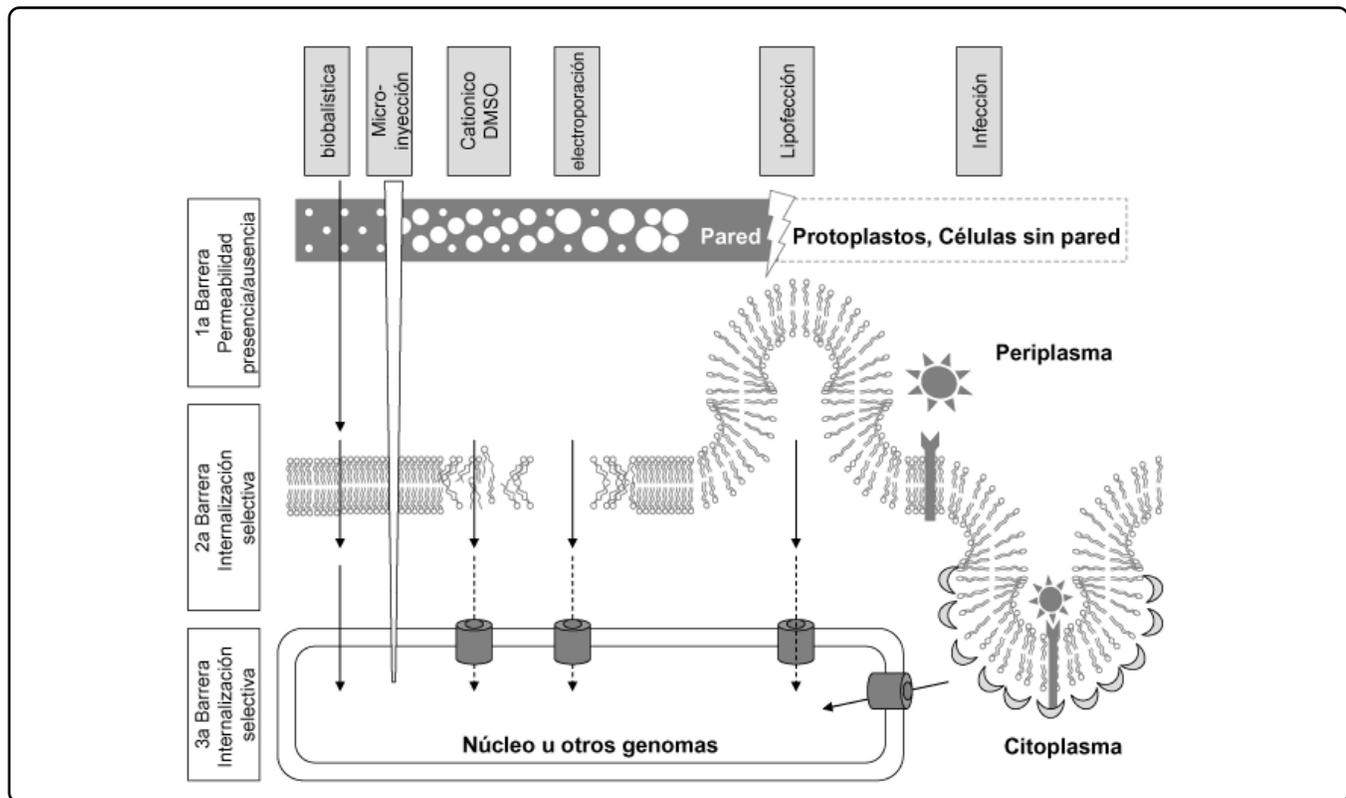


Figura 1. Diferentes formas de introducir material genético extraño en una célula. Existen tres barreras que se deben salvar para lograr la transferencia del material genético. La primera barrera es la permeabilidad de la membrana, la segunda es la internalización selectiva y la tercera es la entrada al núcleo celular. Estos obstáculos se pueden salvar utilizando técnicas como la biobalística, la microinyección, el dimetil sulfóxido, la electroporación, la lipofección con liposomas y la infección viral. Las flechas punteadas indican que el proceso de internalización al núcleo no es directo y que eso disminuye la eficiencia.

bicatenario, entre los que se encuentran moléculas lineales de ADN, moléculas de ADN circular covalentemente cerradas, ARN segmentado o ARN monocatenario de polaridad positiva o negativa, los virus se clasifican con base en estas características además de la presencia o ausencia de envoltura.

La capacidad de los virus para transferir genes de manera natural, es la cualidad más atractiva para convertirlos en una herramienta eficiente en los modelos de transgénesis *in vitro* e *in vivo*⁴. El conocimiento de su biología ha permitido el diseño de vectores recombinantes no replicativos o replicativos, acorde a las necesidades de cada modelo para la transferencia de genes.

3. VECTORES VIRALES

Virus recombinantes

Las partículas virales silvestres no se pueden emplear directamente como vectores de expresión, es necesario convertirlos en virus deficientes en su replicación dentro de la célula diana. De esta forma, el vector viral sólo se podrá multiplicar en las células de empaquetamiento, que son líneas celulares modificadas que tienen la propiedad de ensamblar a los virus y producir partículas virales que poseen los genes que codifican para las proteínas virales y para el gen de interés.

Los virus recombinantes son estructuras capaces de transferir material genético a una célula diana. El uso de la tecnología del ADN recombinante junto con el conocimiento del genoma viral, ha permitido generar viriones con capacidad de infectar y transferir su material genético (transfectar), pero incapaces de replicarse bajo condiciones específicas. Los virus recombinantes

son la herramienta más eficiente en la transgénesis, permiten sobre expresar proteínas en células humanas (Figura 2) y como consecuencia se pueden obtener proteínas recombinantes con un procesamiento postraduccional adecuado⁵.

Entre los virus recombinantes con aplicaciones en transgénesis se encuentran los adenovirus, los retrovirus, los virus adeno asociados, los lentivirus, además de otros ADN o ARN virus.

Los adenovirus

Los adenovirus tienen importancia clínica porque generan infecciones respiratorias y conjuntivales. El prefijo *adeno* deriva del término latino *glándula*, estos virus se aislaron por primera vez en las amígdalas y en las glándulas adenoideas de humanos⁶. Pertenecen al género *Mastadenovirus*, se han identificado un total de 51 serotipos humanos agrupados en seis especies (A-F) que causan infección de tracto respiratorio y gastrointestinal además de ocular⁷. Los adenovirus se utilizan en terapia génica *in vivo*, ya que pueden infectar de forma eficaz células que no están en fase de división y facilitan la expresión de grandes cantidades del producto proteico. Los adenovirus son altamente estables sin integrarse en el material genético de la célula diana⁸. La capacidad para replicarse de los adenovirus *in vivo* depende del tipo de célula diana, un inconveniente es que algunas de las proteínas virales pueden ser tóxicas para la célula. Otra desventaja de estos vectores, es que la expresión de algunas de las proteínas virales puede favorecer una respuesta inmune intensa contra las células diana⁷. Sin embargo, a los vectores de nueva generación les han removido algunos genes y eso ha disminuido ese problema^{9, 10}.

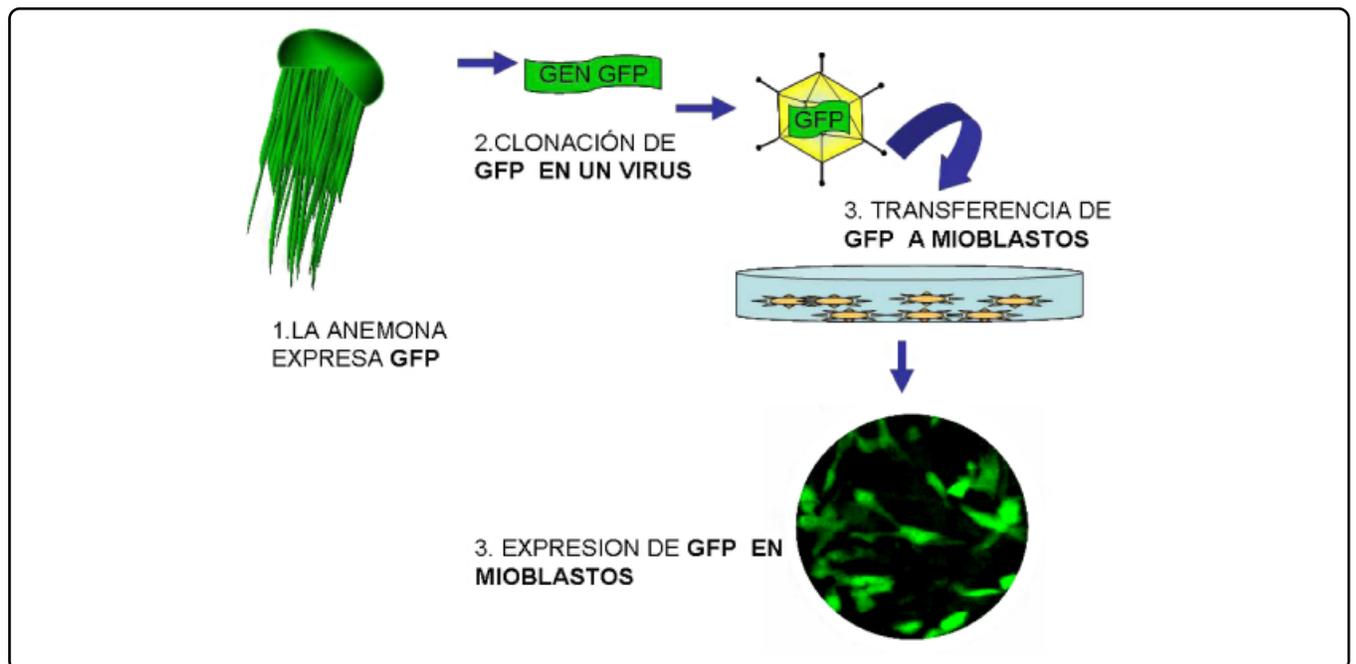


Figura 2. Modelo clásico de la transgénesis. 1. El gen de la proteína verde fluorescente (GFP) proviene de la anémona que constitutivamente expresa a la GFP; 2. El gen se clona en un vector viral, 3. Con esas partículas se infectan mioblastos humanos, el genoma viral se integra en esas células y cuando el transgen se expresa le confiere una nueva característica a la célula eucarionte que es la fluorescencia verde.

Los adenovirus son viriones sin envoltura y con un genoma constituido por ADN de doble cadena de aproximadamente 26-45 kb que se replica en el núcleo de células que se están dividiendo o en células quiescentes. La mayoría de los serotipos utilizan el receptor Coxsackie y el virus receptor (CAR)^{11,12} para una unión primaria y αv integrinas para la internalización¹³. Los adenovirus poseen cuatro unidades transcripcionales en su genoma: E1, E2, E3 y E4; que tienen funciones reguladoras. El gen E1 es esencial para el ensamblaje de las partículas virales. El gen E3 codifica para proteínas involucradas en la evasión del sistema inmune del hospedero (Figura 3).

Otros atributos que hacen de los adenovirus un vector atractivo incluyen la relativa fácil producción de grandes cantidades de virus con un título alto.¹⁴ Además, poseen el potencial de insertar genes de tamaño grande en las construcciones, lo que puede generar virus selectivamente oncolíticos⁷. A la primera generación de adenovirus que se utilizaron como vectores para terapia génica les eliminaron la región E1 porque así se produce un virus deficiente de replicación y así también se elimina su potencial oncogenicidad¹⁵. Las regiones E3 no son esenciales para la replicación viral y si se elimina esta región se aumenta la efectividad del vector. Los virus a los que se les ha removido la región E1 se producen de forma estable en líneas celulares que expresen E1a y E1B como las células humanas embrionarias de riñón 293T¹⁶. A los adenovirus de segunda y tercer generación les han eliminado otras regiones como la E2 o la E4 lo que ha reducido su toxicidad en los modelos animales¹⁷⁻¹⁹. Sin embargo, lo más sorprendente ha sido el desarrollo de virus cooperadores (HD-ADs) a los que les han eliminado todos los genes virales,

ese ha sido el avance más importante para disminuirles la inmunogenicidad, prolongando la expresión del transgene y mejorando la expectativa de los vectores adenovirales para una terapia génica de largo tiempo²⁰. Las ventajas y las desventajas más importantes de cada uno de los vectores virales se resumen en la Tabla 1.

Los virus adeno asociados AAV

Los virus adeno asociados (AAV) están constituidos por ADN de cadena sencilla, requieren de un adenovirus o de un virus herpes que coopere con sus funciones para que se puedan replicar. Los AAV no son patogénicos y su genoma con 4.7 kb contiene dos marcos de lectura (ORF) que están flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR). En la ausencia de un virus cooperador, la doble cadena del ADN viral se integra en el genoma de la célula hospedera gracias a la recombinación dirigida por la región viral *rep*²¹. A los vectores AAV les han removido la mayor parte de su ADN dejando únicamente los ITRs lo que permite incorporar un transgene con una capacidad de aproximadamente 4.9 kb²².

Los AAV son uno de los vectores más utilizados. Principalmente porque inducen una expresión eficiente del transgene por tiempos prolongados en diferentes tejidos como lo son: el hígado, el músculo, la retina y el sistema nervioso central²³. Sin embargo, su capacidad de empaquetamiento se restringe cuando se realiza a gran escala, lo que trae como consecuencia una producción ineficiente. Además, existe una inmunidad preexistente en los humanos para los vectores AAV y la integración en el genoma humano (si llegara a ocurrir) es al azar, la cual

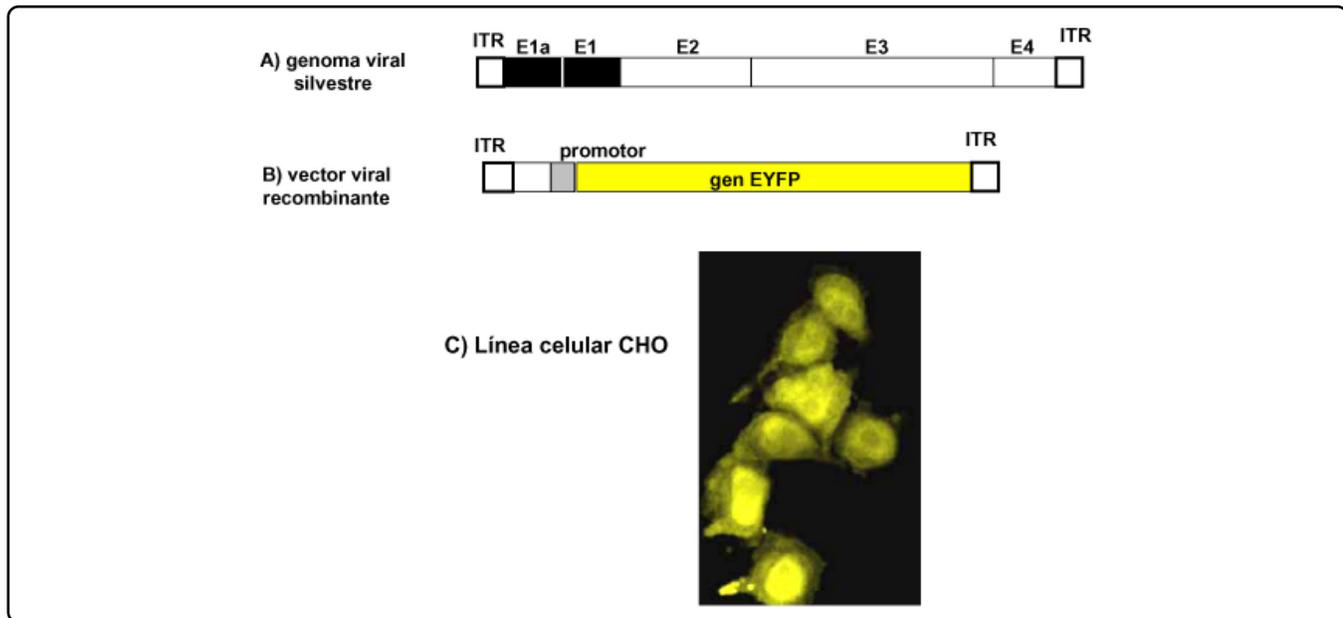


Figura 3. Los vectores adenovirales. A) Estructura del Genoma del adenovirus silvestre. B) Cuando se construye un vector adenoviral no replicativo, el transgene (que en este ejemplo es la Proteína Amarilla Fluorescente EYFP), se introduce en el sitio donde se removieron las regiones E1, E2, E3 y E4 del adenovirus y el gene de interés queda flanqueado por secuencias virales ITR, además se inserta la secuencia de un promotor para aumentar la eficiencia. C) Con esas partículas virales se infecta a la línea celular CHO, y entonces las células expresan la Proteína Amarilla Fluorescente. La fotografía se tomó en el Departamento de Morfología Celular y Molecular. INR.

Vector	Material genético	Capacidad de transgen	Tropismo	Tipode vector	Ventajas	Desventajas
NOENVUELTOS Adenovirus	ADN doble cadena	8 kb	Amplio	Episomal	Extremadamente eficiente	Generan inflamación
AAV	ADN cadena sencilla	<5kb	Amplio excepto para células hematopoyéticas	Episomal	Extremadamente eficiente en la mayoría de tejidos	Generan inflamación
ENVUELTOS Retrovirus	ARN	8 kb	Células en división	Integrado	Persistente y se transfiere en células en división	Pueden inducir ongenesis
Lentivirus	ARN	8 kb	Amplio	Integrado	Persistente en la mayoría de los tejidos	Pueden inducir ongenesis
HSV-1	ADN doble cadena	40kb	Neuronas	Episomal	Capacidad para insertar genes de 40 kb	Expresión transitoria en células diferentes a las neuronas

Tabla 1. Cuadro comparativo de los vectores virales mas utilizados, se destacan sus principales características, además de las ventajas y desventajas de cada uno.

conduce a una activación inesperada o inhibición de la expresión del gen endógeno.

Diferentes serotipos de AAV tienen distintos patrones de expresión debido a diferencias en las células y en las actividades intracelulares. Por ejemplo, el serotipo AAV1 es adecuado para inducir la expresión en el músculo esquelético y la retina, mientras el serotipo AAV5 transduce eficientemente a las neuronas y a las células de pulmón²⁴. Por el contrario, los AAV2 se caracterizan porque se expresan por mayor tiempo, pero los niveles de expresión son pobres, por lo que los AAV7 y AAV9 de monos Rhesus podrían ser una alternativa interesante para la terapia humana²⁵. Otro hallazgo importante de los AAV es que sensibilizan a las células para drogas terapéuticas, de tal forma que la infección con el virus AAV2 incrementa la fragmentación de las células Hela y de las A549 que induce la quimioterapia con cisplatino²⁶.

Los retrovirus

Los retrovirus son virus envueltos, en la fase de lisogenia las nucleocápsides recién formadas migran a la membrana citoplasmática llevándose como envoltura parte de la membrana citoplasmática.

Los retrovirus son los vectores más útiles para la mayoría de los experimentos de terapia génica, son capaces de infectar una amplia gama de tipos celulares. Sin embargo, los retrovirus precisan que las células estén en división para que la forma de provirus (ADN) pueda integrarse en el genoma, con lo que su empleo se restringe a las células en división activa. Una de las grandes ventajas del empleo de retrovirus es la estabilidad funcional y estructural de las formas integradas del vector. A pesar de que los retrovirus pueden integrarse en cualquier parte del genoma, parece que existen ciertos lugares de inserción preferenciales. Cuando los retrovirus infectan a una célula, el

material genético del virus se retrotranscribe de ARN a ADN de doble hebra. Este ADN puede integrarse de forma precisa como copia simple en el genoma de la célula huésped⁷.

Los retrovirus que se han utilizado como vectores para la transfección de genes derivan de modificaciones del virus murino de la leucemia Moloney (Mo-MLV), del virus del sarcoma de Rous o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Las formas deficientes en replicación de estos vectores se obtienen reemplazando las regiones codificadoras para las proteínas virales estructurales *gag*, *pol* y *env* por el gen o genes de interés, lo que permite la incorporación de moléculas de ADN de hasta 8 kb (Figura 4). Los virus empleados como vectores carecen de la secuencia empacadora ψ , además las partículas virales no contienen a los transgenes. Otro punto a considerar, es el de prevenir la recombinación, la cual se logra cuando el virus es capaz de autoreplicarse. Por lo tanto, todas las regiones homólogas dentro del vector viral se remueven, y los genes no esenciales deberán expresarse a una distancia de por lo menos dos unidades transcripcionales, aunque la autorreplicación retroviral ocurra con baja frecuencia²⁷.

Se puede dirigir la expresión del transgen con un promotor o una región potenciadora (enhancer) ubicada río abajo del 5' LTR o bien, con el promotor de un virus alternativo (como el citomegalovirus) o también por promotores celulares como beta-actina. Se ha observado que la remoción de la secuencia *gag* y la región río arriba inmediatamente a ella no afecta el empacamiento viral, cuando se encuentra dentro de las células empacadoras; y tampoco se modifica la expresión del transgen. Sin embargo, la posición exacta del sitio de inicio del transgen y las pequeñas alteraciones en las regiones LTR si afectan de manera considerable la expresión del transgen²⁸.

VERTIENTES

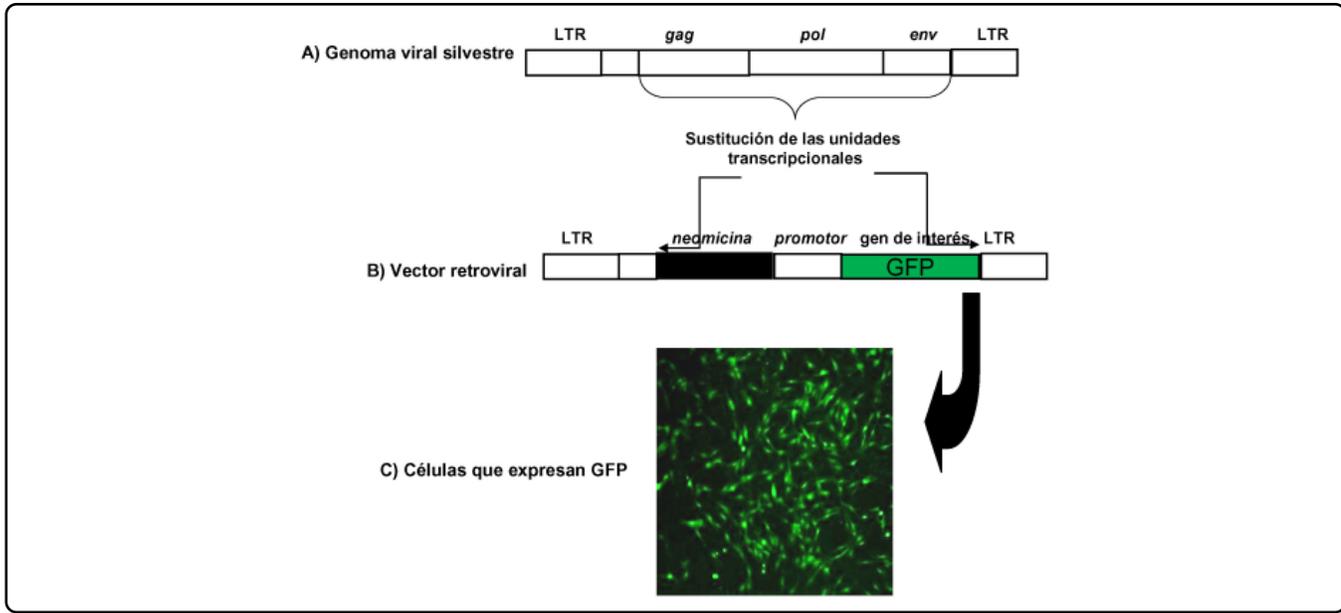


Figura 4. Vectores retrovirales. A) Se muestra la estructura de un virus silvestre que contiene las secuencias de empaquetamiento (ψ) y las secuencias de proteínas virales (*gag*, *pol* y *env*). B) Para obtener un vector retroviral se sustituyen las unidades *gag*, *pol* y *env* por un promotor y dos genes reporteros: el que confiere resistencia a la neomicina y el de la proteína verde fluorescente (GFP), la construcción queda flanqueada por secuencias de repetición (LTR). C) Células eucariotas transformadas con el retrovirus y que expresan el gene GFP.

Los lentivirus

Los lentivirus pertenecen al grupo de los retrovirus, muchos de los vectores lentivirus que se utilizan en terapia génica se basan en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)²⁹. Los vectores HIV pueden permitir insertos de genes grandes e inducir su expresión por mayor tiempo porque se integran en el cromosoma. A diferencia de los retrovirus convencionales, los lentivirus también pueden infectar de forma eficiente a células que no se están dividiendo y por lo tanto se pueden utilizar para la expresión del transgene en las neuronas, de hecho, ya se han logrado introducir exitosamente construcciones con intrones en lentivirus³⁰

Algunos factores moleculares a considerar en la transgénesis

El cDNA introducido en células eucariotes mediante transfección puede expresarse aunque no se encuentre integrado al ADN cromosómico. Esta expresión se puede detectar a partir de las 12 horas de la transfección³¹. Sin embargo, si el transgén permanece episómico se pierde gradualmente de las células, tanto por destrucción como por dilución en la progenie. Por lo tanto, la expresión del ADN no integrado típicamente es transitoria y deja de detectarse después de 72 horas de la transfección³¹. Cuando se trabaja con células que pueden mantenerse en cultivo por varias semanas, es posible generar transfecciones estables seleccionando las células que han integrado el transgén en su ADN cromosómico y que mantienen permanentemente una o varias copias en su genoma y lo transmiten a su progenie.

Una vez que se ha logrado una transgénesis estable, la expresión aún puede afectarse por múltiples factores, por ejemplo, el sitio

de inserción del transgén puede modificar su expresión, ya que puede interactuar con secuencias reguladoras de la transcripción aledañas como promotores, potenciadores (enhancers) y represores (silencers)³². Además, el sitio de inserción del transgén puede interrumpir algún otro gen importante para la sobrevivencia celular.

La expresión de los transgenes integrados se puede apagar a corto plazo por remodelación de la cromatina en la zona de inserción^{32,33}. Estos fenómenos pueden impedirse si durante la construcción del vector se incluyen secuencias de ADN que aíslan al transgén (insulators), como los que están presentes en el locus de la β -globina de pollo³³.

La incorporación de intrones artificiales al final de la secuencia de un transgén resulta en una mejor expresión de éste³⁴. Al parecer esto se debe a que durante la maduración del ARN mensajero se reclutan sobre él proteínas que resultan cruciales para la eficiencia de los siguientes pasos necesarios para la expresión que son: la exportación al citoplasma, la unión al ribosoma y la traducción.

Los promotores útiles en la transgénesis:

Los promotores son secuencias de ADN que reconocen tanto los factores de transcripción como una ARN polimerasa del tipo II y provocan el inicio de la transcripción. En la transgénesis se utilizan diferentes promotores para las células eucariotes, generalmente incluyen algunas secuencias aledañas que los activan hasta 1000 veces, es decir se usan en compañía de sus potenciadores proximales naturales³¹ y su tamaño oscila entre los 500bp y los 2000bp, incluyendo las regiones reguladoras.

Resulta interesante, que aún antes de promover la transcripción, la presencia de un promotor cerca del transgén es útil, ya que facilita el transporte del ADN transgénico al núcleo mediante mecanismos todavía desconocidos, al unir factores de transcripción se favorece que la maquinaria celular reconozca al ADN transgénico como una molécula nuclear y se facilita su traslado al interior de ese compartimiento³⁵. Los promotores que se utilizan en la transgénesis se clasifican en: constitutivos y regulables ó bien en tejido-inespecíficos y tejido-específicos.

a) Los promotores constitutivos, tejido-inespecíficos.

Producen expresiones altas y relativamente constantes de los transgenes en distintos tipos de células eucariotas. El mas utilizado es el promotor del Citomegalovirus (CMV) y el del virus simiano 40 (SMV-40)^{31,34}. Otros promotores de este tipo incluyen los LTRs (del Inglés Long Terminal Repeats) del virus del sarcoma de Rous, o del virus Moloney de la leucemia murina y el promotor del virus de Epstein-Bar^{31,34}. Estos promotores son capaces de mantener la expresión de los transgenes en distintas células de mamíferos ya que responden a múltiples factores de transcripción endógenos, por ejemplo, el promotor de CMV responde a NFkB y a otros factores de transcripción dependientes de AMPc, entre otros³⁶. Los niveles de expresión pueden variar con un mismo promotor dependiendo del tipo celular que se estudie, ya que cada tejido mantiene una combinación distinta de factores de transcripción^{31, 32, 37, 38}.

La principal desventaja de estos promotores es que por su origen viral son susceptibles a inactivarse mediante mecanismos de defensa presentes en las células eucariotas, por ejemplo el promotor de CMV se inactiva por metilación de los dinucleótidos CpG.

b) Los promotores específicos de un tejido.

Estos promotores responden a factores de transcripción que únicamente se expresan en el tejido blanco, lo que genera niveles de expresión moderados o bajos, en comparación con los promotores virales inespecíficos.

c) Los promotores regulables.

Son secuencias que modulan la expresión dependiendo de la concentración de alguna molécula biológica, como las hormonas, la metalotioneína, los metales pesados, los interferones; o a moléculas de respuesta a circunstancias como el choque térmico o la hipoxia^{36,37}.

Los genes reporteros:

Para caracterizar a los promotores y sus secuencias reguladoras, es necesario poder seguir la expresión de alguna proteína cuya función se detecte fácilmente. Los genes reporteros cumplen ese propósito y sirven además para identificar a la transgénesis en el tiempo y en el espacio. Un gen reportero idealmente requiere codificar para una proteína cuya actividad endógena en las células blanco sea nula o muy baja; o que se distinga fácilmente de la actividad endógena. Además no debe ser tóxico para las células y se prefiere que pueda medirse sin destruir al tejido (detección no invasiva), para poder observar el curso temporal de la expresión, sin que esto impida utilizar las células para otros fines posteriormente. Se prefieren proteínas monoméricas sin cofactores, que sean codificadas por ADNc relativamente cortos. Su detección debe ser simple y muy sensible, por lo que generalmente se utilizan fluoróforos o enzimas que generen cromógenos como reporteros. Las actividades enzimáticas ofrecen la ventaja de que el sustrato se acumula, aumentando la posibilidad de detección. Los reporteros utilizados con mayor frecuencia se describen en la Tabla 2, todos ellos pueden emplearse con vectores virales.

**4. APLICACIONES
Investigación y organismos modificados genéticamente**

En general, pueden mencionarse dos grandes áreas de aplicación: las que sirven para investigación básica y médica, donde el animal de elección es el ratón, debido a sus características biológicas (tamaño, manejabilidad, ciclo reproductivo corto, manutención a bajo costo, etc), con ciertas excepciones, ya que en ocasiones no se ajusta estrictamente a las características del

Reportero y fuente	Sistema de detección	Actividad endógena	Estabilidad
Proteína verde fluorescente (GFP)	Fluorescencia, FACS, Microscopía confocal. No invasivo	Nula	Alta resiste fijación
Galactosidasa de <i>E. coli</i>	Colorimetrico. Invasivo	Presente a pH ácido y en senescencia	Alta, resiste fijación, resiste pH 7.5 a 8.0
Luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>	Luminiscente. Emite un fotón al hidrolizar ATP. No invasivo	Nula	Baja
Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) de <i>E. coli</i>	Detección de formas acetiladas de cloranfenicol. Invasiva	Nula	Alta, resiste detergentes
Glucuronidasa de <i>E. coli</i>	Quimioluminiscencia, Fluorescencia, espectrofotometría e histoquímica	Muy baja en plantas	Muy estable a 37°C, resiste hasta 60°C.
Fosfatasas alcalina humana	Espectrofotométrica. Invasiva	Presente	Estable
Hormona del crecimiento humana	Radioinmunoanálisis o ELISA	Nula	Estable

Tabla 2. Cuadro comparativo de los genes reporteros que se utilizan con mayor frecuencia y la fuente, así como el sistema de detección y su estabilidad.

modelo experimental, por lo que es necesario emplear otras especies; y las que tienen un impacto directo sobre la producción y sanidad animal (mejoramiento de especies).

En la investigación biomédica la estrategia es la generación de modelos experimentales “hechos a la medida”, ya sea por la sustitución o la inactivación de genes. En teoría, y con el advenimiento de técnicas de transgénesis nuevas y eficientes, todos los organismos se pueden manipular genéticamente, ya se han utilizado una gran variedad de especies, entre las que se incluyen plantas, y en mayor proporción, animales como el conejo, la oveja, la cabra, el cerdo, la vaca, el pollo, diversas especies de peces, insectos, parásitos, e inclusive el hombre. Los modelos en los cuales se ha inactivado la función de un gen, también referidos como *knock out*, son particularmente útiles para estudiar la carencia de proteínas específicas y pueden servir como modelos de enfermedades humanas³⁹.

La producción de proteínas recombinantes es uno de los principales éxitos de la biotecnología. Las principales compañías del mercado biotecnológico ya han puesto en marcha las primeras granjas biofarmacéuticas en las que, de forma experimental, rebaños de vacas, ovejas y cabras transgénicas están produciendo sustancias de uso terapéutico. Purificando la leche se elaboran medicamentos contra el enfisema, la hemofilia, la artritis reumatoide, el cáncer o el SIDA, entre más de un centenar de enfermedades.

Los xenotransplantes (utilización de animales como donantes) representan un avance prometedor ante la actual demanda y escasez de órganos. El cerdo es un candidato ideal para convertirse en donante universal. Por otro lado, una causa importante del fracaso de los xenotransplantes es el rechazo hiperagudo que se produce cuando el organismo que recibió el xenotransplante reconoce la presencia del órgano de otra especie⁴⁰. El primer paso consiste en la obtención de cerdos transgénicos capaces de expresar el antígeno regulador del complemento humano, evitando así el rechazo hiperagudo, otras estrategias consisten en bloquear la expresión de la α -1,3-galactosiltransferasa, que es la enzima involucrada en la síntesis de los carbohidratos de superficie en las células del cerdo⁴¹.

Por otra parte, en la industria agroalimentaria, se tiene la esperanza de crear plantas que produzcan vacunas ingeribles para humanos⁴², o plantas con contenidos nutricionales mejorados. Si estas proteínas se encuentran en cantidad suficiente en el vegetal y se pueden separar fácilmente, el cultivo en el campo de estas plantas transgénicas, seguido del proceso de extracción y de saneamiento, permitirá obtener una gran cantidad de proteínas a un costo de producción relativamente bajo. Esta opción evita también el riesgo de contaminación, contrariamente a lo que sucede con los animales, las plantas no son portadoras de virus patógenos para el hombre.

Terapia génica; Aplicaciones de la transgénesis en humanos. la terapia se usa exclusivamente para tratar enfermedades

hereditarias monogénicas, es decir, provocadas por la alteración de un solo gen, mediante la introducción de un gen diseñado para que suministre una nueva propiedad a las células, por ejemplo que obstaculice la replicación del virus o bloquee una proteína efectora, lo que frenaría el progreso de la enfermedad.

Dado que existe una respuesta biológica natural de silenciamiento específico de genes estimulada por la presencia de ARN de interferencia, se ha desarrollado una estrategia alternativa para combatir enfermedades infecciosas o degenerativas la cual consiste en la generación de anticuerpos recombinantes bloqueadores que se expresen en el interior de las células, estos anticuerpos intracelulares o “intrabodies” se pueden generar al introducir a las células blanco los genes de las cadenas V_H y V_L junto con secuencias específicas de localización subcelular para que los anticuerpos recombinantes se transporten a algún compartimiento como el núcleo, las mitocondrias o el retículo dependiendo del lugar donde se encuentre la molécula a bloquear⁴³. Existen anticuerpos intracelulares desarrollados experimentalmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson⁴⁴, Huntington⁴⁵ y Alzheimer⁴⁶; enfermedades virales como el herpes virus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV)⁴⁷, virus del papiloma (HPB)⁴⁸, virus de la hepatitis C (HCV), rotavirus. En el área de la Oncología este tipo de moléculas no sólo han servido para el área clínica, si no también para dilucidar algunos mecanismos involucrados en la transformación⁴⁹.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mulligan, RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993;**260**:926-32.
2. Jolly, D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994;**1**:51-64.
3. Gao, X and Huang, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1995;**2**:710-22.
4. Warnock, JN, Daigre, C and Al-Rubeai, M. Introduction to viral vectors. *Methods Mol Biol* 2011;**737**:1-25.
5. Navarro, J, Oudrhiri, N, Fabrega, S and Lehn, P. Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;**30**:5-11.
6. Rowe, WP, Huebner, RJ, Gilmore, LK, Parrott, RH and Ward, TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;**84**:570-3.
7. Young, LS, Searle, PF, Onion, D and Mautner, V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006;**208**:299-318.
8. Lundstrom, K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003;**21**:117-22.
9. Schiedner, G, Morral, N, Parks, RJ, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998;**18**:180-3.
10. Stecher, H, Shayakhmetov, DM, Stamatoyannopoulos, G and

- Lieber, A. A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2001;**4**:36-44.
11. Bergelson, JM, Cunningham, JA, Droguett, G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;**275**:1320-3.
12. Tomko, RP, Xu, R and Philipson, L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:3352-6.
13. Wickham, TJ, Mathias, P, Cheresch, DA and Nemerow, GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;**73**:309-19.
14. Hutchins, B, Sajjadi, N, Seaver, S, Shepherd, A, Bauer, SR, Simek, S, Carson, K and Aguilar-Cordova, E. Working toward an adenoviral vector testing standard. *Mol Ther* 2000;**2**:532-4.
15. Bett, AJ, Haddara, W, Prevec, L and Graham, FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**:8802-6.
16. Graham, FL, Smiley, J, Russell, WC and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;**36**:59-74.
17. Lusky, M, Christ, M, Rittner, K, et al. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 1998;**72**:2022-32.
18. O'Neal, WK, Zhou, H, Morral, N, et al. Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum Gene Ther* 1998;**9**:1587-98.
19. Andrews, JL, Kadan, MJ, Gorziglia, MI, Kaleko, M and Connelly, S. Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. *Mol Ther* 2001;**3**:329-36.
20. Morsy, MA and Caskey, CT. Expanded-capacity adenoviral vectors—the helper-dependent vectors. *Mol Med Today* 1999;**5**:18-24.
21. Kotin, RM, Menninger, JC, Ward, DC and Berns, KI. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 1991;**10**:831-4.
22. Samulski, RJ, Chang, LS and Shenk, T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989;**63**:3822-8.
23. Rabinowitz, JE and Samulski, J. Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 1998;**9**:470-5.
24. Davidson, BL, Stein, CS, Heth, JA, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:3428-32.
25. Gao, GP, Alvira, MR, Wang, L, Calcedo, R, Johnston, J and Wilson, JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:11854-9.
26. Duverger, V, Sartorius, U, Klein-Bauernschmitt, P, Krammer, PH and Schlehofer, JR. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer* 2002;**97**:706-12.
27. Glorioso, JC, DeLuca, NA and Fink, DJ. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 1995;**49**:675-710.
28. Kim, SH, Yu, SS, Park, JS, Robbins, PD, An, CS and Kim, S. Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 1998;**72**:994-1004.
29. Vigna, E and Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2000;**2**:308-16.
30. Kay, MA, Glorioso, JC and Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001;**7**:33-40.
31. Kommareddy, S, Tiwari, SB and Amiji, MM. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol Cancer Res Treat* 2005;**4**:615-25.
32. He, TC, Zhou, S, da Costa, LT, Yu, J, Kinzler, KW and Vogelstein, B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:2509-14.
33. Dmitriev, I, Krasnykh, V, Miller, CR, Wang, M, Kashentseva, E, Mikheeva, G, Belousova, N and Curiel, DT. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998;**72**:9706-13.
34. van Beusechem, VW, van Rijswijk, AL, van Es, HH, Haisma, HJ, Pinedo, HM and Gerritsen, WR. Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther* 2000;**7**:1940-6.
35. Li, ZB, Zeng, ZJ, Chen, Q, Luo, SQ and Hu, WX. Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer* 2006;**6**:66.
36. Gomez-Navarro, J and Curiel, DT. Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Lancet Oncol* 2000;**1**:148-58.
37. Douglas, JT, Miller, CR, Kim, M, Dmitriev, I, Mikheeva, G, Krasnykh, V and Curiel, DT. A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol* 1999;**17**:470-5.
38. Liu, XY, Gu, JF and Shi, WF. Targeting gene-virotherapy for cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;**37**:581-7.
39. Li, X, Chen, G and Yang, B. Urea Transporter Physiology Studied in Knockout Mice. *Front Physiol* 2012;**3**:217.
40. Cooper, DK, Ekser, B, Burlak, C, et al. Clinical lung xenotransplantation - what donor genetic modifications may be necessary? *Xenotransplantation* 2012;**19**:144-58.
41. Park, JY, Park, MR, Bui, HT, et al. alpha1,3-Galactosyltransferase Deficiency in Germ-Free Miniature Pigs Increases N-Glycolylneuraminic Acids As the Xenoantigenic Determinant in Pig-Human Xenotransplantation. *Cell Rerogram* 2012;**14**:353-63.

VERTIENTES

42. Pelosi, A, Shepherd, R and Walmsley, AM. Delivery of plant-made vaccines and therapeutics. *Biotechnol Adv* 2012;**30**:440-8.
43. Stocks, M. Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2005;**9**:359-65.
44. Maguire-Zeiss, KA, Wang, CI, Yehling, E, et al. Identification of human alpha-synuclein specific single chain antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**349**:1198-205.
45. Colby, DW, Chu, Y, Cassady, JP, et al. Potent inhibition of huntingtin aggregation and cytotoxicity by a disulfide bond-free single-domain intracellular antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:17616-21.
46. Paganetti, P, Calanca, V, Galli, C, Stefani, M and Molinari, M. beta-site specific intrabodies to decrease and prevent generation of Alzheimer's Abeta peptide. *J Cell Biol* 2005;**168**:863-8.
47. Corte-Real, S, Collins, C, Aires da Silva, F, Simas, JP, Barbas, CF, 3rd, Chang, Y, Moore, P and Goncalves, J. Intrabodies targeting the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency antigen inhibit viral persistence in lymphoma cells. *Blood* 2005;**106**:3797-802.
48. Griffin, H, Elston, R, Jackson, D, Ansell, K, Coleman, M, Winter, G and Doorbar, J. Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *J Mol Biol* 2006;**355**:360-78.
49. Paz, K, Brennan, LA, Iacolina, M, Doody, J, Hadari, YR and Zhu, Z. Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. *Mol Cancer Ther* 2005;**4**:1801-9.