

Terapia génica en reumatología pediátrica

Consuelo Modesto

Reumatología Pediátrica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

(An Esp Pediatr 2002; 56 [Supl 6]: 515-520)

INTRODUCCIÓN

En 1972, Friedmann y Roblin (1), abrieron las puertas a un nuevo concepto de tratamiento de aquellas enfermedades en las que un error genético es la principal causa. ¿Por qué no sustituir el gen defectuoso por un gen sano, en el que la secuencia anómala haya sido corregida?. Las ideas de hoy pueden ser en el futuro el tratamiento más eficaz de una enfermedad, pero estos dos momentos, a menudo, están separados por un largo camino en el que la investigación va avanzando despacio, buscando como meta poder aplicar la nueva idea al ser humano.

Como se indica en la figura 1 el fundamento de la terapia génica es sencillo: en un determinado gen, falta o es defectuosa parte de la secuencia (dibujada en grana); mediante un transportador, llamado vector, que sea capaz de entrar en el núcleo de la célula, podríamos hacer que la secuencia de DNA defectuosa fuera sustituida por una secuencia correcta. El resultado final es un nuevo gen, que posee la estructura necesaria para que se produzca una proteína, un enzima funcionalmente activo y en la cantidad adecuada. Explicada así, la terapia génica podría resultar tan sencilla que la pregunta lógica sería: ¿por qué no se utiliza ya de forma sistemática en aquellas enfermedades cuyo error genético ha sido determinado?. El cúmulo de problemas técnicos al que se enfrentan los investigadores a la hora de intentar introducir un gen, o parte de él, dentro de la secuencia de DNA de una célula eucariota está fuera de los límites de esta presentación. Como muestra, citaremos sólo parte de las dificultades para encontrar el vector adecuado. El vector ideal sería aquel que fuera no-tóxico, no-inmunogénico, fácil de producir en grandes cantidades, eficaz a la hora de proteger el DNA en su camino hacia el núcleo celular y preferiblemente con un tropismo especial hacia determinado tipo celular (2). Este vector ideal, hoy por hoy, no existe. Los vectores más utilizados hasta el momento han sido los adenovirus ya que pueden introducirse en células en reposo y células en división, pero generan una respuesta inmunogénica (inflamatoria) importante por parte del huésped. Los llamados virus adeno-asociados, infectan asimismo todo tipo de

células, no son inmunogénicos, pero en contrapartida la cantidad de DNA que son capaces de transportar es pequeña. Los avances se hacen ahora en vectores no virales, liposomas y complejos péptidos/proteínas capaces de transportar DNA. Simplemente para poder alcanzar el núcleo celular, el vector debe “proteger” el DNA transportado de los enzimas del medio intercelular, atravesar con él la triple capa que constituye la membrana celular, protegerlo de ser destruido por los lisosomas citoplasmáticos, y, de nuevo, atravesar con él una segunda membrana, en este caso la que separa citoplasma y núcleo (remitimos al lector a los artículos de revisión citados en la bibliografía).

¿POR QUÉ UTILIZAR LA TERAPIA GÉNICA EN LA ENFERMEDAD REUMÁTICA?

La entidad nosológica mejor conocida y más frecuente en Reumatología Pediátrica es la Artritis Idiopática Juvenil (previamente artritis crónica juvenil). Sin embargo, ésta no parecía a priori el mejor candidato para ser tributario de terapia génica ya que los factores genéticos que la determinan, nos son, hoy por hoy, en términos generales desconocidos. Como puede verse en la figura 2, varias entidades pediátricas, en las que la causa ha podido ser encontrada en el error de transcripción de un solo gen, están siendo tratadas ya,

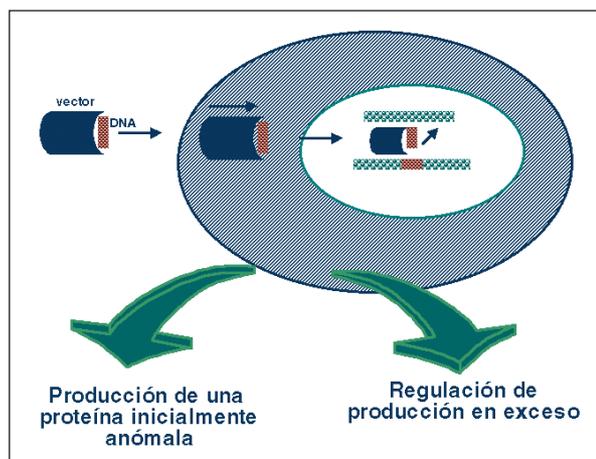


Figura 1. Esquema de la terapia génica.

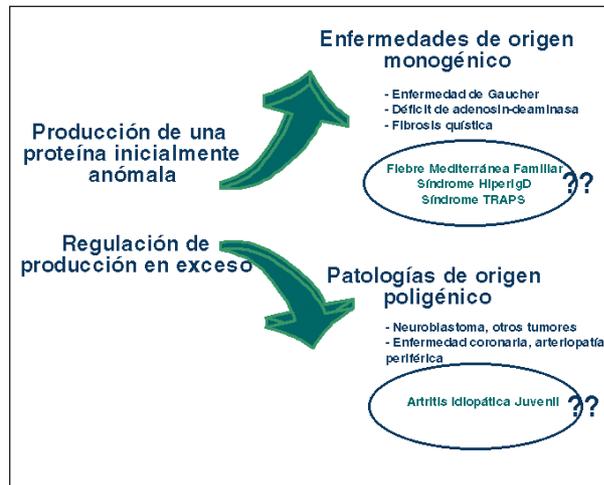


Figura 2. Aplicación de la terapia génica.

aunque todavía en fase de investigación, en el ser humano mediante terapia génica. Para todos es conocida la alteración encontrada en la fibrosis quística, en la proteína reguladora de la conducción (CFTR) transmembrana de cloro, para la que existen ya varios estudios doble ciego, placebo-control, utilizando adenovirus y liposomas como vectores del DNA correcto (3,4).

En RP tenemos el ejemplo de un grupo de enfermedades, que llevan la alteración en un gen determinado como marcador: este grupo está constituido por las fiebres recurrentes (5). Aunque existen cuadros intermedios y cuadros no clasificables en las tres entidades que mencionaremos, las causas de fiebre recurrente mejor conocidas hoy son: a) la Fiebre Mediterránea Familiar (FMF); b) el síndrome hiperIgD (HID) y c) el síndrome asociado al receptor de TNF anómalo (TRAPS). A pesar de conocer bien las alteraciones génicas de estas entidades, para ninguna de ellas se ha propuesto la posibilidad de realizar terapia génica. ¿Por qué?. Establecer una terapia como el tratamiento de elección requiere: 1. Saber que la mutación o mutaciones del gen son la **causa** de la enfermedad; 2. No contar con otra terapia eficaz, más segura y más económica que la que proponemos; 3. Debe ser técnicamente realizable; 4. Estar libre de efectos secundarios previsible graves.

Esta serie de condiciones explican porqué, aún siendo las fiebres recurrentes susceptibles de terapia génica, ésta no se haya contemplado aún como primera posibilidad. En la FMF, la/s mutaciones en el gen MEFV situado en el cromosoma 16, parecen ser la causa de la enfermedad, ya que éste gen da lugar a la síntesis de una proteína llamada pirina o marenostrina que originaría los accesos febriles. Sin embargo, desconocemos cuáles son las otras funciones fisiológicas

de esta proteína, y, en muchos de los casos la terapia ya existente con colchicina es eficaz en prevenir la amiloidosis secundaria y la aparición de nuevos accesos febriles.

En el HID, el gen marcador se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12, y sintetiza una proteína esencial en la cadena formadora del colesterol: la mevalonato-quinasa. Como consecuencia, la actividad del enzima se encuentra reducida a un 5- 15% de lo normal en los pacientes afectados de HID, y la cantidad de ácido mevalónico en orina se eleva ligeramente durante los accesos de fiebre. Ahora bien, desconocemos cuál es la relación exacta entre la alteración en la producción de la mevalonato-quinasa y la aparición de fiebre. Por tanto, si bien las mutaciones en este gen nos sirven de marcador, no podemos establecer una relación causal.

En el tercer caso, el TRAPS o "Hibernian fever" en la literatura anglosajona, sí que establece una relación causal entre la alteración funcional del receptor p55 del TNF α y la aparición de fiebre. Sin embargo, con la aparición de una molécula de síntesis idéntica al receptor de TNF α (al otro componente: p75) denominada "Etanercept" y comercializada para el tratamiento de la artritis reumatoide en un principio, el futuro del tratamiento del TRAPS parece estar en la utilización de ésta molécula (6,7) y no en la corrección génica del error en p55.

Si nos fijamos ahora en la parte inferior de la figura 2, veremos cómo aparece la terapia génica aplicada a enfermedades en las que hay un componente hereditario pero no ligado a un gen concreto. En ellas, la terapia génica se dirige a modificar la respuesta del organismo tras la aparición de la enfermedad. No va a corregir la causa de la misma, sino que se presenta como un procedimiento terapéutico más. En el caso de los tumores, del neuroblastoma infantil por ejemplo, la terapia génica busca cambiar la respuesta inmune frente al tumor estimulando la activación de células T citotóxicas, aumentar la muerte de células tumorales por apoptosis mediante el transfer de moléculas inductoras de apoptosis como p53, o bien provocar la muerte de dichas células por agentes anti-virales tras el transfer de moléculas que hacen a la célula sensible a la acción de estos fármacos (herpes simplex timidina-quinasa, por ejemplo). Es en este nuevo campo de la terapia génica donde su aplicación a la enfermedad reumática tiene, a corto-medio plazo, un papel más claro, y en el que hay un mayor bagaje de experimentación animal acumulado.

TERAPIA GÉNICA EN LA ARTRITIS CRÓNICA. EVITAR LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

Sin olvidar que la Artritis Idiopática Juvenil (AIJ), tiene unas características clínicas propias y, probable-

mente, una etiopatogenia propia, que la separan de la Artritis Reumatoide (AR) del adulto, los datos que presentaremos a continuación se basan en la literatura referente a esta entidad dada la ausencia de estudios específicos para la forma infantil.

Sin que podamos entrar en detalles de la etiopatogenia de la artritis crónica, es conocido por todos cómo, en la articulación inflamada, existe un predominio de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF α). La acción de ambas es compleja, ya que son capaces de estimular distintas estirpes celulares: incrementan su propia producción de forma paracrina actuando sobre monocitos y macrófagos; estimulan la expresión de moléculas de adhesión en la célula endotelial y en los fibroblastos lo que lleva a un reclutamiento de neutrófilos y linfocitos hacia la articulación; producen la liberación desde fibroblastos y condrocitos de metaloproteinasas, en particular de estromalisina y colagenasas, que degradan la matriz intercelular del cartílago; y por último, son capaces de activar la osteoclastogénesis, directamente y tras el reclutamiento de células T CD4+ activadas (8). Para muchos, la persistencia en la articulación de estas citoquinas proinflamatorias son la causa principal del daño articular.

En diferentes modelos animales, la terapia génica ha intentado bloquear estas citoquinas proinflamatorias, introduciendo los genes de los receptores solubles de TNF α , IL-1 o el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), o bien, incrementando la producción de citoquinas con actividad anti-inflamatoria: IL-10, IL-4, IL-13. Nos fijaremos en los que hasta el momento han tenido un mejor rendimiento: IL-1Ra y IL-10.

IL-1Ra. La eficacia de aumentar la expresión local de IL-1Ra ha sido probada tras la transfección de distintas estirpes celulares mediante diferentes vectores, utilizando la artritis inducida en roedores como modelo animal.

Bakker y col.(9), introdujeron DNA de IL-1Ra humano en una línea celular de fibroblastos (NIH-3T3). Dos mil células transfectadas fueron inyectadas en la cavidad articular de la rodilla del ratón, poco antes del comienzo previsto de los síntomas en la artritis inducida por colágeno (CIA). En la población de ratones tratados, se consiguió retrasar significativamente el comienzo de la artritis, así como disminuir la severidad de la misma. El estudio anatómo-patológico reveló cómo las células transfectadas se situaban a lo largo de la superficie de recubrimiento sinovial y permanecían estables tras 14 días de seguimiento. La producción de IL-1Ra se mantuvo durante períodos prolongados de tiempo.

Este estudio contaba con dos limitaciones importantes: 1) el vector utilizado era un retrovirus, capaz de infectar solamente células en división; 2) por este moti-

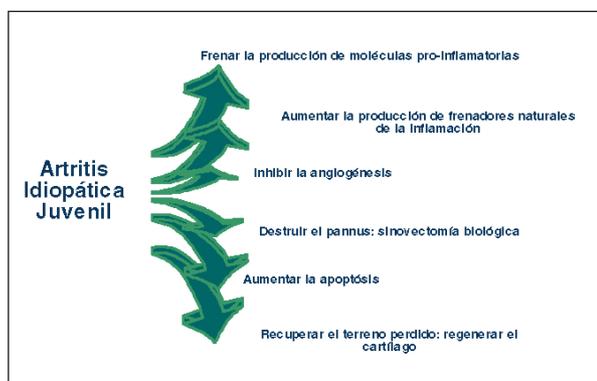


Figura 3. Terapia génica en la artritis crónica.

vo se había utilizado una línea celular para ser transfectada, y no tejido sinovial autólogo.

Durante los años siguientes el trabajo de los investigadores se ha centrado en la búsqueda del vector idóneo. Tras la utilización de diferentes generaciones de adenovirus, los denominados virus adenoasociados (AAV) fueron elegidos como vectores con una elevada eficacia en el transfer del cDNA-IL-1Ra, lo que facilita una prolongada transducción del mismo. Pan y col.(10) demostraron la eficacia de la expresión de IL-1Ra por parte de sinoviocitos mediada por AAV en la artritis inducida por lipo-polisacáridos en ratas, incluso tras una segunda estimulación mediante LPS 100 días tras la transfección con AAV. Otro receptor de IL-1, el hIL-1RII ha sido eficaz en prevenir la artritis inducida por colágeno en ratones, tras ser transfectado en queratinocitos humanos implantados subcutáneamente en el ratón.

La hiperexpresión de IL-1Ra en la articulación, no sólo suprime la inflamación, sino que, lo que es de capital importancia para el tratamiento, también normaliza la función de síntesis de los condrocitos en el cartílago articular. En ratones, se ha podido demostrar cómo IL-1Ra previene la progresiva degradación del cartílago que acompaña a la proliferación sinovial.

En contraposición a los datos alentadores para IL-1Ra, la investigación llevada a cabo con terapia génica utilizando el receptor p55 de TNF α , no ha sido eficaz para controlar los cambios inflamatorios en la artritis inducida en ratas.

Los datos obtenidos para IL-1Ra mediante terapia génica son especialmente interesantes si se tiene en cuenta que la administración de IL-1Ra recombinante como tratamiento de la artritis reumatoide se encuentra con dos obstáculos importantes: su vida media corta (tan sólo seis horas en plasma), y la necesidad de administrar cantidades enormes (de 10 a 1000 veces en exceso) para contrarrestar el efecto de IL-1. Todos estos hechos han llevado a IL-1Ra a ser la primera mo-

lécula utilizada en un ensayo clínico, mediante terapia génica, en pacientes afectos de artritis reumatoide (ver más adelante).

IL-10. IL-10 e IL-4 son capaces de inhibir la producción de TNF alpha e IL-1 por las células sinoviales y, al mismo tiempo, de incrementar la producción de sus inhibidores como IL-1Ra, receptor soluble de IL-1, receptor soluble de TNF e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.

IL-10 es ante todo un potente inhibidor de TNF alpha. Cuando IL-10 es transfectado utilizando adenovirus como vector, el efecto inhibidor de la artritis se produce no solamente en la articulación inyectada, sino en el resto de las articulaciones de la misma extremidad. Este hecho está de acuerdo con la idea de que TNF alpha es un importante mediador en la diseminación de la artritis a las articulaciones ipsilaterales.

Los datos más interesantes vienen tras la utilización de la llamada IL-10 viral (vIL-10), una molécula homóloga a la IL-10 humana producida por el virus de Epstein-Barr. vIL-10 es capaz de suprimir la respuesta inmune, pero sin embargo, carece de algunos de los efectos inmunoestimuladores de la IL-10 humana. Utilizando de nuevo adenovirus como vector, Lechman y col. (11) pusieron de manifiesto que, en la artritis inducida en el conejo, vIL-10 reduce significativamente la cantidad de leucocitos, disminuye la proliferación sinovial, impide la degradación del cartílago y mantiene los niveles de síntesis de la matriz del mismo. Curiosamente, este efecto anti-artritogénico se observó también en las articulaciones contralaterales utilizadas como control. Los autores sugieren que, algunas de las células infectadas son capaces de emigrar ("trafficking") y quedar albergadas en la articulación contralateral, impidiendo la aparición de artritis. Efectos similares fueron obtenidos tras la administración única endovenosa de 10^9 unidades del constructo adenovirus-vIL-10 en ratones en los que se indujo artritis por colágeno (CIA).

De nuevo, vIL-10 tiene un interés especial dado que los ensayos clínicos utilizando IL-10 recombinante han sido decepcionantes; como para IL-1Ra quizá la causa sea la corta vida media de la molécula. De ahí que no sea ilógico encontrar que es eficaz cuando hay una producción constante por parte de las propias células del individuo.

Los investigadores en terapia génica en citoquinas se acercan cada vez más a argumentar sobre la utilización de una terapia combinada: una molécula con efecto bloqueante, como IL-1Ra, junto con una citoquina anti-inflamatoria, como IL-10, en el mismo constructo. Sin embargo, aún estamos lejos de tener la bioterapia ideal.

SIGUIENDO LOS PASOS DE LA TERAPIA ONCOLÓGICA. SINOVECTOMÍA BIOLÓGICA

Si volvemos a la figura 2, recordaremos que la terapia génica puede ser utilizada en oncología para provocar la muerte tisular, haciendo a los tejidos sensibles a algunos agentes retrovirales.

La forma más simple es transfectar las células con la timidina-quinasa del virus herpes-simple (HSV-tk). Esta enzima transforma el fármaco ganciclovir en un nucleótido análogo que es incorporado al genoma de las células en las que existe replicación del DNA. Este análogo causa detención prematura de la síntesis de DNA y por tanto tiene un efecto tóxico para las células en división. El estudio en conejos y en primates a los que se administra a la vez adenovirus-HSV-tk intraarticular y ganciclovir intravenoso, muestran cómo se produce una ablación efectiva de la sinovial, no quirúrgica (12).

De igual forma un camino eficaz para impedir el crecimiento del tejido sinovial es bloquear la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes. En esta formación, VEGF (vascular endothelial growth factor) tiene un papel esencial. Mediante la utilización de una secuencia anti-sentido dirigida contra los receptores de VEGF, Marchand y col. (13) fueron capaces de reducir hasta en un 80% la formación de nuevos vasos en el modelo animal.

Otra estrategia, como ya se ha nombrado en el caso de los tumores, es introducir genes activadores de la apoptosis, como p53 o el ligando-Fas (14).

RECUPERAR EL TERRITORIO PERDIDO. REGENERAR EL CARTÍLAGO

El primer objetivo con respecto al cartílago es perder la menor cantidad del mismo, protegerlo. Al hablar de la terapia con IL-1Ra hemos mencionado cómo el bloquear IL-1 lleva a una protección de la función de los condrocitos y previene la progresiva pérdida de cartílago articular.

Un paso más es intentar recuperar el cartílago lesionado, rellenar las áreas que han quedado denudadas. Conocemos múltiples factores que estimulan la síntesis de la matriz (IGF-1, BMP-2) o estimulan la diferenciación condrogénica (TGFbeta). Sin embargo, recuperar el cartílago no es tan sencillo. Aún pudiendo incrementar la síntesis de IGF-1 (insulin-growth-factor) y BMP-2 (bone-morphogenetic-protein) por las células de la sinovial, se produce tan solo un efecto discreto sobre la síntesis de la matriz del cartílago en lesiones experimentales en roedores.

Para poder recuperar la lesión necesitamos que aumente de forma importante el número de células condrogénicas en el seno de la propia lesión. Esto requiere otros procedimientos adicionales como penetrar en profundidad en el hueso subcondral para permitir que

elementos de la médula irrumpen en la lesión o realizar implantes de condrocitos o de células condrogenitoras, *ex vivo*.

Parece que las células madre mesenquimales, derivadas de la médula ósea (MSCs), una vez implantadas, son más eficaces que los propios condrocitos en la tarea de reparar lesiones cartilaginosas producidas en el modelo animal. Si se transfiere TGF-beta1-DNA a estas células en cultivo se produce su diferenciación hacia la línea condrogénica. La posibilidad de transducir estas células con genes que promuevan su diferenciación hacia condrocitos e incrementar el depósito de matriz intercelular una vez que la diferenciación se haya producido es particularmente atractiva.

Los investigadores intentan combinar la simplicidad del transfer de genes *in vivo* con las ventajas de incrementar la celularidad en las lesiones (hasta el momento sólo mediante una actuación *ex vivo*), buscando cuáles son los genes diana de las células condrogenitoras existentes en las áreas lesionadas.

PRIMEROS ENSAYOS EN EL SER HUMANO

Hace ahora aproximadamente un año, el reconocido reumatólogo inglés Marc Feldman felicitaba a los investigadores en terapia génica de las enfermedades inflamatorias, por haber seguido en su empeño por encontrar una terapia mejor a pesar de la trágica e inesperada muerte de un paciente incluido en un protocolo de terapia génica (no reumatológica). Pero este hecho nos recuerda que, sólo aquellas terapias cuya seguridad ha sido probada reiteradamente en el modelo animal, pueden ser contempladas como de posible aplicación en el ser humano.

Evans y col. Iniciaron el diseño del primer ensayo clínico utilizando terapia génica en artritis reumatoide en 1989. Sólo siete años más tarde se llevó a cabo el tratamiento en el primer paciente. Los principales objetivos de este estudio eran determinar la posibilidad de transferir cDNA de IL-1Ra en las articulaciones de pacientes con AR, de forma que el gen se expresara intraarticularmente, y comprobar que el procedimiento era seguro y bien aceptado por los pacientes. Por ser el primer ensayo terapéutico, se tomaron las máximas precauciones para asegurar que el procedimiento estuviera exento de riesgos.

Sin entrar en los detalles del estudio diremos que consistió en el transfer "ex vivo" (lo cual requiere una cirugía inicial para recolectar sinoviocitos del paciente) de cDNA de IL-1Ra utilizando un agente retroviral como vector. Tras el tratamiento de nueve pacientes, los autores afirman que el procedimiento es seguro y que se produce una expresión biológicamente activa de IL-1Ra en las articulaciones tratadas. El mismo equipo ha

iniciado un estudio doble-ciego para conocer la eficacia del tratamiento. Es decir, el primer estudio se dirigió a conocer la seguridad del procedimiento; el segundo a saber su rentabilidad. Un proyecto similar al descrito, utilizando también IL-1Ra, se ha puesto en marcha en Alemania.

Otros dos ensayos clínicos paralelos se están llevando a cabo en EEUU y Europa, utilizando el gen de la timidina-quinasa del herpes-simple con el fin de obtener una sinovectomía biológica (ver más arriba). Los vectores no son iguales ya que el estudio europeo continúa usando adenovirus, mientras que el estudio americano utiliza plásmidos como vector.

CONCLUSIÓN

Como en otros campos de la investigación médica, la terapia génica va dando sus pasos para pasar de ser tan sólo una idea a constituir una alternativa terapéutica real. Aún estando lejos de considerarla como la terapia de elección por su facilidad, rentabilidad y bajo coste (claramente no es así hoy por hoy), hay que dejar la puerta abierta a todas las posibilidades que en el futuro nos podrá ofrecer. ¿Hubiéramos soñado en poder hacer una sinovectomía sin abrir la articulación hace unos años?. No podemos olvidar que la terapia biológica con moléculas sintéticas o anticuerpos monoclonales ya es parte de la rutina clínica diaria. Quizá podamos obtener en un futuro los resultados óptimos combinando ambas terapias biológicas: administración de moléculas sintetizadas en el laboratorio más terapia génica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Friedmann T., Roblin R. Gene therapy for human genetic disease?. *Science* 1972, 175: 949-55.
2. Balicki D., Beutler E. Gene therapy of human disease. *Reviews in Molecular Medicine*. Medicine (Baltimore) 2002, 81: 69-86.
3. Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, Moss RB, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P. Efficiency and persistent gene transfer of AAV-CTFR in maxillary sinus. *Lancet* 1998, 351:1702-3.
4. Welsh MJ, Zabner J. Cationic lipid mediated gene transfer of CTFR: Safety of the single administration to the nasal epithelia. *Hum Gene Ther* 1999, 10:1559-72.
5. Drench JPH, van der Meer J. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001, 345(24):1748-1757.
6. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol* 2000, 12:479-86.
7. Drewe E, McDermott EM, Powell RJ. Treatment of the nephrotic syndrome with etanercept in patients with the tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *N Engl J Med* 2000, 343:1044-45.
8. Choy E., Panayi G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001, 344:907-916.

9. Bakker AC, Joosten LAB, Arntz OJ. Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum* 1997;40:893-900.
10. Pan RY, Chen SL, Xiao X y col. Disease-inducible transgene expression from a recombinant adeno-associated virus vector in a rat arthritis model. *J Virol* 1999, 73:3410-3417.
11. Lechman ER, Jaffurs D, Ghivizzani SC, Gambotto A, Kodesvi I, Mi Z, Evans CH, Robbins PD. Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol* 1999, 163:2202-2208.
12. Goossens PH, Schouten GJ, Thart BA y col. Feasibility of adenovirus-mediated nonsurgical synovectomy in collagen-induced arthritis-affected rhesus monkeys. *Hum gene Ther* 1999, 10:1139-1149.
13. Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF, Sirois MG. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 282 (1):H194-204.
14. Ghivizzani SC, Oligino ThJ, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH. Gene therapy approaches for treating rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 2000, 379S:288-299.