

Nefrología y terapia génica: ciencia básica para el clínico

En la última década la ingeniería genética ha desarrollado técnicas que han hecho posible, por una parte, transferir e incorporar genes a células, tejidos u órganos e incluso a la totalidad de las células de un ser vivo (animales transgénicos) y, por otra, suprimir la expresión de un gen dado (suprimir la síntesis de la proteína para la cual el gen codifica). Estos rápidos avances están abriendo las puertas a la era de la terapia génica.

Existen métodos físicos y biológicos de transferencia génica¹. Los primeros se utilizan para transferir genes a líneas celulares en cultivo. Básicamente se trata de incubar células con el ADN del gen de interés, empleando fosfato cálcico o electricidad, para aumentar la permeabilidad de la membrana celular al ADN, haciendo posible que éste se incorpore al genoma celular. Mediante estas técnicas es posible obtener expresiones transitorias del gen transferido. Si bien la transitoriedad presupone una limitación metodológica importante, han resultado de gran utilidad para el desarrollo de los sistemas biológicos de transferencia génica.

Los métodos biológicos de transferencia génica utilizan virus principalmente adenovirus y retrovirus. Los retrovirus son virus de ARN que poseen la enzima transcriptasa inversa, específica de estos virus y de la cual derivan su nombre. Esta enzima es capaz de hacer el proceso normal de transcripción —síntesis de ARN a partir de un molde de ADN— en sentido opuesto. Los retrovirus penetran a las células a través de un receptor de membrana. Una vez en el citoplasma el ARN del virus, primero hace la transcripción inversa de su ARN formando ADN complementario (ADNc). Seguidamente, el ADNc del virus entra en el núcleo y se integra en el genoma celular, proceso dirigido por la enzima viral integrasa. El genoma viral (provirus) se hereda en forma Mendeliana en las células hijas. Dado que el provirus codifica también por su promotor (región del gen que regula su transcripción), las células infectadas expresan el gen viral de manera tal que sintetizan partículas virales indefinidamente. Además, es interesante señalar que las partículas virales forman su membrana a expensas de la propia membrana celular de la célula infectada. El ciclo biológico de los retrovirus puede resultar totalmente inocuo para la célula infectada, de allí la facilidad de producir retrovirus en el laboratorio.

La utilización de retrovirus para la transferencia genética se basa en estas características únicas del ciclo biológico de los retrovirus. Un requerimiento importante para que los retrovirus puedan completar su ciclo biológico es que las células huésped deben estar en fase de replicación (fase S del ciclo celular) para poder incorporar el genoma viral. Este hecho, cuya explicación no se conoce bien, constituye una limitación importante². En efecto, la mayor parte de las células de un organismo adulto, y muy especialmente el tejido renal, se encuentran en fase de quiescencia y por lo tanto no serían susceptibles de incorporar el genoma viral.

Las técnicas actuales de ingeniería genética permiten modificar el genoma viral. Así, con el uso de enzimas de restricción (endonucleasas) es posible cortar y remover fragmentos del genoma viral potencialmente patógenos o que no son de interés. En una segunda etapa, se emplean técnicas de transferencia física para incorporar en las células productoras de virus hasta 10 KB de ADN del gen a transferir, de manera tal que la nueva partícula viral, al infectar una nueva célula es capaz de incorporar en ella el gen de interés².

Recientemente en el Departamento de Nefrología de la Universidad de California en Los Angeles se han desarrollado con éxito dos métodos de transferencia genética en riñón de mamífero. En el primero de éstos³ se empleó la técnica del trasplante de metanefros. Con esta técnica descrita previamente por Woolf y cols.⁴ se demostró la posibilidad de crear riñones quiméricos en ratones, donde el tejido metanéfrico de ratón era capaz de completar su desarrollo al ser transplantado en un riñón de ratón neonato. Este tejido metanéfrico presenta una alta replicación celular, haciendo posible la incorporación del genoma retroviral⁵. En un segundo modelo, se utilizó el ácido fólico, sustancia capaz de producir una necrosis tubular aguda reversible seguida de una fase de reparación con una intensa replicación celular. De esta forma se consiguió una «ventana biológica» específica, durante

la cual sólo las células del epitelio tubular pueden ser infectadas por un retrovirus y por lo tanto ser susceptibles de transferencia genética⁶.

El factor más importante al intentar desarrollar técnicas de transferencia génica es sin duda la obtención y producción del vector retroviral. Para la obtención del vector viral en el citado trabajo de Woolf y col⁵ se empleó el retrovirus Psi-2 BAG que ha sido utilizado con éxito para transferir o incorporar genes en otros tejidos. Esta célula productora de virus es un producto de ingeniería genética derivada de fibroblastos a los cuales se les ha transferido el gen del vector BAG. En cultivo, estas células producen la partícula viral (BAG), lo que permite la obtención del vector viral de transferencia en el laboratorio. El vector retroviral BAG codifica el gen lac-z cuyo producto es la enzima beta galactosidasa. Es importante destacar que para controlar las infecciones retrovirales se han desarrollado técnicas que, mediante el uso de endonucleasas específicas, permiten remover parte del genoma viral que codifica para la replicación del mismo. De esta forma una partícula viral es capaz de infectar sólo una célula. Esto si bien disminuye la eficacia de la transferencia génica, evita la propagación descontrolada de partículas virales.

Para la realización del trasplante de metanefros se emplearon ratones obtenidos a las dos semanas de gestación. El tejido metanérico obtenido fue incubado con una suspensión del vector viral y trasplantado en riñón de ratones recién nacidos. Para desarrollar el método de transferencia génica en ratas adultas se empleó el ácido fólico. A la dosis utilizada (240 mg/kg), el ácido fólico indujo una necrosis tubular aguda subclínica (poliuria) seguida de una recuperación ad integrum (histológica y funcional). El vector viral se inyectó en el parénquima renal 48 h después de la administración del ácido fólico, período de máxima replicación celular (timidina tritiada).

Para demostrar la incorporación del gen (provirus) en el genoma renal se empleó la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento de 559 pares de bases del provirus BAG y posteriormente se visualizó en una electroforesis de gel de agarosa. La expresión de la enzima beta galactosidasa se estudió en cortes histológicos congelados con la técnica de X-gal, específica para la enzima.

En estos experimentos, si bien no se cuantificó la cantidad de células que integraron el gen transferido en su genoma, es interesante señalar que la expresión del producto del gen se observó en una proporción menor a la de su integración en el genoma renal, a juzgar por los resultados obtenidos mediante X-gal y PCR respectivamente. Así, mientras el PCR fue positivo en el 90% de los microtrasplantes, su expresión genética se pudo demostrar en el 30% de los casos. En cuanto a los animales tratados con ácido fólico se demostró la transferencia génica en el 50% de los casos. De éstos en algo más de la mitad se pudo demostrar la expresión del gen transferido.

Estos resultados son congruentes con los de otros investigadores que señalan que la integración del virus en la célula no garantiza la expresión del gen transferido. Esta falta de expresión del gen transferido ha sido previamente descrita por otros investigadores⁸. Este problema podría ser resuelto con el uso de distintos promotores que puedan ser mejor expresados por las células renales.

Estos experimentos preliminares han sido el primer paso en el camino hacia el logro de la terapia génica renal. Aunque estos resultados demuestran la posibilidad de la transferencia de genes a tejidos renales es evidente que serán necesarios futuros estudios para mejorar los resultados. Así, en el método de microtrasplantes metanéricos la supervivencia del implante es menor a largo plazo por la isquemia o el rechazo del injerto después de uno a tres meses. Dado que esta técnica depende fundamentalmente de la supervivencia del implante, este hecho sugeriría que este abordaje experimental requiriera el uso de agentes inmunosupresores que eviten el rechazo. En este sentido el modelo del ácido fólico ofrecería ciertas ventajas como simplicidad, y evitaría el uso de inmunosupresores. Es importante además destacar que otros investigadores han conseguido asimismo la transferencia génica en el riñón utilizando el modelo de trasplante de metanefros⁷.

En 1994 se han publicado dos interesantes estudios; en uno de ellos se empleó un adenovirus para transferir el mismo gen obteniéndose una mayor expresión genética aun sin la necesidad de inducir replicación celular⁹. Esta propiedad de los adenovirus presenta asimismo la desventaja que el ADN permanece en el citoplasma celular en vez de integrarse en el genoma celular como en el caso de los retrovirus. En el otro trabajo, en una primera fase se empleó el vector retroviral BAG y se transfirió a las células mesangiales de rata en cultivo. En una segunda fase se inyectaron estas células mesangiales, como un vector del retrovirus, en la arteria renal de rata. Los autores pudieron demostrar la expresión del retrovirus en el área mesangial del glomérulo renal. Finalmente, en una ter-

cera fase se indujo una forma reversible de glomerulonefritis mesangial que abrió una «ventana biológica», que permitió aumentar la expresión génica del retrovirus¹⁰.

Además de las enfermedades renales con base genética, los avances en la ingeniería genética están haciendo posible el desarrollo de diversos protocolos terapéuticos. Cabría citar la transferencia de un gen que codifica por una proteína con propiedades antibióticas o con propiedades de disolver cálculos. Recientemente, Fleischer y col.¹¹ han demostrado la posibilidad de sintetizar hormonas en fibroblastos modificados mediante la transferencia genética con vectores retrovirales. En este sentido sería deseable disponer de la posibilidad de que un producto proteico sea preferencialmente secretado en la vía urinaria —lado apical de las células tubulares— o por el lado basolateral hacia el intersticio renal³.

Es importante señalar que la terapia génica no abarca solo técnicas de incorporación de genes sino además técnicas que permiten suprimir la expresión de genes con potencialidad patógena. Así, recientemente se han desarrollado dos técnicas que permiten suprimir la expresión génica. En primer lugar la técnica denominada del «antisense» donde el empleo de secuencias complementarias en sentido opuesto de ácidos nucleicos son capaces de hibridizarse (unirse) a la secuencia homóloga del genoma celular impidiendo de esta forma la expresión genética. Y en segundo lugar, la transferencia o empleo de enzimas con capacidad de degradar moléculas específicas de ARN, conocida como ribozimas, que permiten suprimir la expresión del gen por el cual codifican.

Entre las patologías que podrían beneficiarse de técnicas que permiten la supresión de la expresión de genes cabría citar, al menos en el campo experimental, diversas formas de glomerulonefritis. En efecto, en los últimos años se ha demostrado la participación de diversas citoquinas como mediadoras de lesión en algunas formas experimentales de glomerulonefritis. Así, Border y col.¹² demostraron que la administración de anticuerpos contra el factor de crecimiento transformador beta es capaz de suprimir la progresión en un modelo experimental de glomerulonefritis. Similares resultados han podido ser demostrados al suprimir el efecto del factor de crecimiento derivado de plaquetas¹³ así como de la interleuquina 1¹⁴ en otros modelos experimentales de glomerulonefritis.

Pero a corto plazo, es posiblemente en el área de la oncología, donde la terapéutica genética puede ofrecer interesantes resultados. En efecto, las células tumorales en fase de alta replicación ofrecen la posibilidad de emplear vectores retrovirales específicos. Así la transferencia del gen de la interleuquina 2 a células tumorales de rata ha demostrado ser efectiva para que éstas sean reconocidas y destruidas por el propio sistema inmunológico¹. El Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH) tiene aceptados y en estudio 58 proyectos de investigación en terapéutica genética humana entre los que cabría destacar: oncología —Hodgkin, leucemia, mama, ovario, melanoma, riñón, neuroblastoma; fibrosis quística; hipercolesterolemia familiar; trasplante de médula ósea y síndrome de inmunodeficiencias¹⁵. Finalmente, es posible ahora vislumbrar que, en un futuro, la nefrología pueda engrosar la lista de proyectos de investigación en terapia génica humana.

Ricardo J. Bosch

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina
Universidad de Alcalá, Madrid, España

1. Gutiérrez AA, Lemoire NR, Sikora K. Gene therapy for cancer. *Lancet* 1992; 339: 715-21.
2. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4239-42.
3. Woolf AS, Bosch RJ, Fine LG. Gene transfer into the mammalian kidney: First steps towards renal gene therapy. *Kidney Int* 1993; 43, sup 39: S116-9.
4. Woolf AS, Palmer SJ, Fine LG. Creation of a functioning chimeric mammalian kidney. *Kidney Int* 1990; 38: 991-7.
5. Woolf AS, Bosch RJ, Fine LG. Gene transfer into the mammalian kidney: Microtransplantation of retrovirus-transduced metanephric tissue. *Exp Nephrol* 1993; 1: 41-8.
6. Bosch RJ, Woolf AS, Fine LG. Gene transfer into the mammalian kidney: Direct retrovirus-transduced of regenerating tubular cells. *Exp Nephrol* 1993; 1: 49-54.
7. Koseki C, Hertzlinger D, Al-Aqwqati Q. Integration of embryonic nephrogenic cells carrying a reporter gene into functioning nephrons. *Am J Physiol* 1991; 261: C550-4.
8. Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WRA, Miller AD. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1330-4.