

Terapia génica: los ácidos nucleicos como fármacos. Mecanismos de acción y vías de entrega a la célula

Gene therapy: nucleic acids as drugs. Action mechanisms and delivery into the cell

Dr. Brian M. Cavagnari^a

RESUMEN

La terapia génica involucra la transferencia de material genético a una célula para conseguir un beneficio terapéutico, por lo que ofrece una nueva opción para el tratamiento de muchas patologías. En este artículo se presentan algunos de los nuevos fármacos a base de ácidos nucleicos, como plásmidos, aptámeros, oligonucleótidos, ribozimas y pequeños ácidos ribonucleicos de interferencia. Se comenta el mecanismo y nivel de acción de estos agentes terapéuticos y se discuten sus varias vías de administración, como liposomas, polímeros catiónicos, transferencia directa de ácidos nucleicos y vectores virales.

Palabras clave: *terapia génica, ribozimas, aptámeros, oligonucleótidos, vectores virales.*

SUMMARY

Gene therapy involves the transference of new genetic material to the cell in order to obtain a therapeutic benefit, offering a new option for the treatment of various diseases. In this article, some of these nucleic acid-based drugs, such as plasmids, aptamers, oligonucleotides, ribozymes and small interfering ribonucleic acid, are presented. Their mechanism and level of action is commented and several delivery systems, such as liposomes, cationic polymers, direct nucleic acid transfer and viral vectors, are also discussed.

Key words: *gene therapy, ribozymes, aptamers, oligonucleotides, viral vectors.*

INTRODUCCIÓN

El impacto de la biología molecular sobre la medicina modificó inicialmente la forma de comprender la enfermedad, para luego involucrarse en su diagnóstico. Al día de hoy, se posiciona como una de las herramientas más importantes para el tratamiento de distintas patologías y promete modificar sustancialmente la práctica médica durante el presente siglo,¹ tanto por la disponibilidad de fármacos obtenidos por biotecnología, como por el desarrollo de la terapia génica (TG).

El propósito de este artículo es compartir algunos de los ambiciosos objetivos de la TG, así como comentar cuáles son las moléculas terapéuticas que se introducen en la célula y las distintas formas de entrega del material genético utilizadas para cumplir su objetivo.

TERAPIA GÉNICA

La TG se basa en la introducción de nuevo material genético dentro de una célula para conseguir un beneficio terapéutico.^{2,3}

Cuando la base molecular de la enfermedad a tratar consiste, por ejemplo, en la ausencia de un producto determinado debido a un gen nativo defectuoso (Factor IX, en la hemofilia B; distrofina, en la distrofia de Duchenne, etc.), se podría introducir directamente una copia adicional del gen normal para restablecer la función. Esto se conoce como *suplementación génica* y es la estrategia que la mayoría de los médicos generalistas considera como sinónimo de TG. Pero la TG involucra también otras estrategias.

Ante una situación opuesta a la del ejemplo previo, cuando la expresión de un gen favorece el desarrollo de una enfermedad, sea éste un gen nativo (oncogenes para el desarrollo de cáncer) o material genético viral (multiplicación y desarrollo de la infección), se pueden introducir oligonucleótidos antisentido o ribozimas, para evitar la expresión del gen en cuestión. Esto se conoce como *supresión génica*.

Por otra parte, muchas veces la pre-

a. Departamento de Pediatría. Hospital Alemán. Buenos Aires.

Correspondencia:
Dr. Brian M. Cavagnari:
bcavagna@gmail.com

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 11-1-2011
Aceptado: 2-5-2011

sencia de unas pocas proteínas mutantes puede interferir con la función de muchas proteínas normales. Esto se denomina *efecto negativo dominante*. Basándose en este hecho, otra estrategia de TG consiste en introducir en la célula secuencias que codifiquen proteínas mutantes para que interfieran, por ejemplo, con las proteínas necesarias para el correcto armado de un virus y así actuar frente a infecciones.

Otro ejemplo de TG consiste en introducir un "gen suicida" de manera específica en células neoplásicas o infectadas con un patógeno peligroso, para que sólo estas células blanco sean destruidas, no viéndose afectadas las células sanas circundantes.

Vemos así, como la TG no consiste únicamente en la introducción de una copia sana de un gen, sino que existen muchas otras estrategias muy originales, algunas de las cuales iremos comentando a medida que analicemos qué material genético se introduce en la célula blanco y con qué propósito.

Conceptualmente, la TG puede realizarse en la línea germinal o en células somáticas.

TG de línea germinal

Si se alteran genéticamente las células de la línea germinal, todas las células del organismo presentarán la modificación y todo cambio introducido pasará a la descendencia,² con lo que surgirían evidentes planteos éticos sobre la alteración de la herencia humana.

En el presente artículo sólo se discutirá la TG de células somáticas.

TG de células somáticas

En ella, se altera genéticamente un solo órgano o tejido del individuo, sin afectar sus células germinales y, por lo tanto, no existen efectos sobre la descendencia.

A su vez, se puede realizar *ex-vivo* (se obtienen células del paciente, se transfiere el material genético deseado mediante un vector adecuado, se seleccionan y se reimplantan en el paciente) o *in-vivo* (se administra el material genético terapéutico directamente al paciente).²

Habiendo expuesto los objetivos y tipos de TG, debemos enfocarnos en dos aspectos básicos para entender su alcance: qué material terapéutico se utiliza y cómo se lo introduce en la célula.

¿Qué material terapéutico se introduce en la célula?

Para realizar TG se pueden introducir en la célula blanco diferentes estructuras constitui-

das por ácido desoxirribonucleico (ADN) (como plásmidos, aptámeros y oligonucleótidos) o ácido ribonucleico (ARN) (como ribozimas, ARN de interferencia, aptámeros y oligonucleótidos, entre otras).⁴⁻⁶

Plásmidos

Los plásmidos son estructuras de ADN de cadena doble que existen en procariotas (bacterias) y en algunos eucariotas (levaduras). Naturalmente, los genes presentes en el plásmido le confieren a las bacterias portadoras ciertas cualidades, como la resistencia antibiótica.

En el contexto de la TG, los plásmidos se pueden utilizar como herramientas que lleven incorporados un promotor y el gen productor de la proteína deseada. Se los puede considerar como profármacos, ya que, una vez internalizados en la célula del paciente, su secuencia se transcribe y luego traduce a la proteína que cumple la función terapéutica.⁷

Los plásmidos son relativamente fáciles de purificar y manipular. Los mayores inconvenientes se relacionan con su rápida degradación y su expresión temporaria.⁸

Inicialmente se los utilizó solo para tratar enfermedades monogénicas, como la inmunodeficiencia combinada grave debida al déficit de adenosina deaminasa,⁹ pero actualmente su uso incluye patologías de etiología más compleja, como Parkinson,¹⁰ Alzheimer¹¹ y cáncer,¹²⁻¹⁴ entre otras.

Los plásmidos también se emplean actualmente como vacunas de ADN que confieren una inmunización genética.¹⁵

Aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos que no existen naturalmente. Para su creación, primero se sintetizan diferentes cadenas de oligonucleótidos en forma aleatoria, las cuales luego se incuban con las moléculas blanco de interés, hasta encontrar las que –de acuerdo a su estructura tridimensional– presentan mayor avidez de unión. Finalmente, se amplifican los oligonucleótidos que presentan la mayor afinidad.

Así, los aptámeros pueden interactuar directamente con las proteínas involucradas en el desarrollo de una enfermedad o con sus factores de transcripción.^{16,17} Su comportamiento es similar al de los anticuerpos, pero los aptámeros serían muy específicos y menos inmunogénicos.¹⁸ Su mayor limitación estaría dada por su corta semivida.

A modo de ejemplo, se han ensayado aptáme-

ros contra priones¹⁹ y contra infecciones como hepatitis C,²⁰ HIV,²¹ y hepatitis B,²² entre otras.

El organismo estadounidense de control de fármacos (*United States Food and Drug Administration*, FDA) aprobó el primer aptámero de uso terapéutico. Se trata de un fármaco antiangiogénico para el tratamiento de la degeneración macular neovascular asociada a la edad. Se llama Pegaptanib y actúa por unión al factor de crecimiento del endotelio vascular, cuya actividad inhibe.²³

Oligonucleótidos

Son ácidos nucleicos pequeños de cadena simple que, tras su internalización, pueden impedir la expresión de una proteína específica involucrada en el desarrollo de una enfermedad.^{24,25}

Pueden actuar uniéndose directamente al gen, formando una estructura de *triplex* con la doble cadena de ADN e impidiendo su transcripción. También pueden usarse como oligonucleótidos antisentido, en donde se unirán al ARN mensajero (ARNm), para formar un *duplex* e impedir su traducción.

Una limitación importante para el uso clínico de los oligonucleótidos es su dificultad para llegar al citoplasma o al núcleo de la célula blanco con su actividad funcional intacta. Actualmente, los oligonucleótidos de tercera generación son más resistentes a las nucleasas.

Los oligonucleótidos se han ensayado para el tratamiento de patologías como el cáncer,²⁶⁻²⁸ la atrofia muscular espinal²⁹ e infecciones por citomegalovirus (CMV),³⁰ hepatitis C^{20,31} y papilomavirus,³² entre otras.

Un oligonucleótido antisentido (Fomivirsén) fue aprobado por la FDA para tratar la retinitis causada por CMV en pacientes inmunocomprometidos con lo cual se ha convertido en el primer fármaco basado en ácidos nucleicos.³³

Ribozimas

Son moléculas de ARN que, gracias a su estructura terciaria, presentan actividad enzimática: cortan y pegan ARN en sitios específicos. Existen ribozimas naturales que han sido descritas en virus, procariotas y eucariotas. En el laboratorio, se pueden generar ribozimas sintéticas, con la capacidad de dirigir el corte hacia una secuencia específica de blanco.

Presentan la ventaja de ser específicas y poco inmunogénicas, pero las principales dificultades para su uso terapéutico son su baja estabilidad y lo dificultoso de colocalizar la ribozima con la secuencia contra la cual está dirigida.

Estas moléculas han sido ensayadas en diferentes órganos, como músculo y cerebro³⁴ y en el tratamiento de diversas patologías, como hepatitis C²⁰ y B,³⁵ e infecciones por CMV.³⁶

Normalmente, el transcripto primario (ARN con intrones y exones) sufre modificaciones posttranscripcionales para convertirse en un ARNm maduro.³⁷ La eliminación de los intrones se produce durante el corte y empalme (*splicing*). Este proceso celular se lleva a cabo por estructuras de ARN denominadas espliceosomas.

Teniendo esto en cuenta, las ribozimas no solo pueden eliminar los ARNm involucrados en una patología, sino que también pueden reparar el ARNm del gen mutado, a través del *trans-splicing* del ARN mediado por espliceosoma (SMART, por *Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing*).

Esta prometedora estrategia ha sido ensayada, entre otras, en patologías como fibrosis quística,^{38,39} hemofilia A⁴⁰ y enfermedades neurodegenerativas.⁴¹

ARN de interferencia

La interferencia del ARN es un fenómeno natural que lleva a silenciar la expresión de un determinado gen, por un mecanismo postranscripcional.

En líneas generales, cuando una célula incorpora, por infección viral o por transferencia, moléculas de ARN de cadena doble, éstas son cortadas por una enzima en fragmentos más pequeños (21-23 nucleótidos) llamados ARN pequeños de interferencia (siRNA, por *small interfering RNA*). Estos se acoplan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por *RNA-induced silencing complex*), donde una de las hebras se degrada y la otra (hebra antisentido) identifica al ARNm complementario que se desea anular. Finalmente, se cortará el ARNm blanco y se evitará la expresión del gen involucrado en la patología.⁴²

Las células de mamífero se pueden transfectar con vectores que expresen siRNA o se pueden inyectar con siRNA sintéticos, obteniéndose resultados similares.⁴³⁻⁴⁵

Cabe destacar que el efecto "silenciador" de genes es temporalmente limitado y que los siARN pueden ser degradados por ribonucleasas endógenas en su camino a la célula. En el laboratorio, se pueden modificar químicamente para incrementar su estabilidad.

Actualmente, se ensaya su uso terapéutico contra patología oncológica⁴⁴ y contra infecciones como la del VIH.²¹

¿Cómo se introduce el material genético en la célula?

Para introducir ácidos nucleicos en la célula se pueden utilizar vectores virales y no virales.

Vectores virales

Los virus introducen su material genético en las células de manera eficiente, por lo que suena lógico su uso como vectores del material genético a introducir, sustituyendo el genoma propio del virus por un ácido nucleico terapéutico.⁴⁶⁻⁴⁹ En la práctica, la mayoría de los protocolos de TG utiliza virus como vectores, habiéndose ensayado en patologías como la distrofia muscular,⁵⁰ el cáncer⁵¹ y el sida.⁵²

Si bien los virus son muy eficientes para introducir el material genético en la célula, todavía resta mejorar aspectos relacionados a la seguridad de su empleo y a su inmunogenicidad.⁸

Retrovirus

En el laboratorio se generan retrovirus con toda la maquinaria necesaria para su incorporación en la célula blanco, pero cuyo material a transferir sea el ácido nucleico terapéutico en lugar del genoma viral.⁵³

Estos pueden transportar hasta 8 kb (suficiente para prácticamente todos los ácidos nucleicos terapéuticos) pero, salvo los *Lentivirus*, sólo pueden integrar su genoma en células en división activa.⁵³⁻⁵⁵

Otra complicación importante es que la integración en el genoma celular ocurre de manera azarosa, pudiendo ocasionar la disrupción de un gen funcional (mutagénesis insercional).

Los *Retrovirus* han sido empleados en protocolos para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada grave debida a déficit de adenosina deaminasa,^{56,57} cáncer de ovario,⁵⁸ melanoma⁵⁹ y enfermedad de Gaucher,⁶⁰ entre otras patologías.

Herpesvirus

Poseen dos características muy interesantes para su uso: 1) al ser neuropáticos, resultan muy útiles para introducir genes en células del sistema nervioso; 2) al mantenerse en estado latente, pueden persistir por mucho tiempo en el tejido nervioso.

Su ADN no se integra al del huésped, pero se mantiene establemente de manera episómica y se divide junto al ADN cromosómico. Por lo tanto, tampoco se ve interrumpido ningún gen endógeno.^{61,62}

La gran desventaja es que no se los ha podido atenuar, por lo que suelen ser líticos para las células que los reciben.

Adenovirus

Los adenovirus tienen ADN de cadena doble, el cual ingresa a la célula infectada sin integrarse en su genoma.

Resultan interesantes para dirigir el material genético a células del epitelio respiratorio y gastrointestinal, aprovechando su vía de infección normal. Infectan tanto células en división como las que no lo están.

Como el genoma viral no se replica durante la división celular, la información no se transmite a la descendencia, por lo que su uso en TG es transiente. Además, podrían desencadenar una marcada respuesta inmunitaria sobre la célula huésped.²

Los *Adenovirus* han sido empleados en protocolos para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, ovario y melanoma metastásicos,^{63,64} y ensayados contra entidades tan diversas como la isquemia^{65,66} y el glioblastoma.⁶⁷

Virus adenoasociados

Los virus adenoasociados tienen ADN de cadena simple, el cual ingresa a la célula infectada y pasa al ADN de cadena doble. Luego se integra en el genoma del huésped, generalmente en el cromosoma 19, reduciendo las chances de mutagénesis insercional.

Infectan eficientemente tanto células en división como células que no se dividen. Para replicarse dentro de la célula necesitan la coinfección de otro virus. Su capacidad es limitada (menos de 4 kb) y no se asocian a ninguna enfermedad humana, por lo que se ven reducidas eventuales reacciones adversas.^{68,69}

Estos virus han sido ensayados en protocolos de TG contra enfermedades como fibrosis quística,⁷⁰ artritis y hemofilia.⁷¹

Vectores no virales

Los vectores no virales generalmente no presentan inmunogenicidad (como los vectores virales), pero son menos eficientes a la hora del ingreso del material genético a la célula.⁸

Liposomas

Los liposomas no presentan especificidad para ningún tipo celular y su entrega de material genético es mucho menos eficaz que la mediada por virus. No obstante, algunos liposomas se pueden

dirigir mediante la modificación de sus lípidos de pared⁷²⁻⁷⁸ o por su acople a sustancias, como la vitamina A, o a fragmentos de anticuerpos (inmunoliposomas).⁷⁹

Se ha logrado así, entregar material genético terapéutico para patologías como fibrosis quística,⁷³ carcinoma hepatocelular,⁷⁴ melanoma⁷⁵ y psoriasis,⁷⁷ entre muchas otras.

Complejo asialoglicoproteína-polilisina y otros polímeros catiónicos

La polilisina (carga positiva) se une al ADN (carga negativa), mientras que la asialoglicoproteína permite su ingreso a los hepatocitos (poseen un receptor para moléculas que perdieron su ácido siálico).⁸⁰⁻⁸³

Otros polímeros catiónicos utilizados son la polietilenimina⁸⁴⁻⁸⁷ y el quitosano.⁸⁸⁻⁹¹

Los polímeros catiónicos han sido empleados para dirigir la entrega de material genético a células hepáticas,⁸¹ respiratorias,⁸⁶ y corneales,⁸⁹ entre otras.

Cromosomas artificiales

Pueden transferir grandes segmentos de ADN. Al mantenerse como episoma (material genético que puede existir de manera independiente al genoma del huésped) de forma estable, no se corre el riesgo de mutagénesis insercional.

Además, pueden llevar varias secuencias regulatorias que permitan –en función del promotor que se utilice– obtener la expresión histoespecífica del gen. Como ejemplo, si se coloca un gen de interés bajo el promotor de la alfa-fetoproteína, se logrará su expresión en los hepatocitos y no en otras células.⁹²⁻⁹⁴

Los cromosomas artificiales están siendo ensayados para diversas patologías, como el glioblastoma⁹⁵ o la distrofia muscular de Duchenne,⁹⁶ entre otras.

Transferencia directa de ácidos nucleicos

La incorporación directa de ácidos nucleicos puede lograrse por electroporación (aplicación de una carga eléctrica sobre la membrana plasmática) o por unión a esferas pequeñas que pueden –a su vez– ser acopladas a ligandos específicos que dirijan el material hacia un tejido específico.⁹⁷ Estas técnicas (eléctricas y mecánicas) pueden aplicarse *ex-vivo*^{98,99} o *in-vivo*.¹⁰⁰⁻¹⁰² La entrega de material genético es mucho menos eficaz que la mediada por virus.

Esta estrategia se ha usado para ensayar TG contra el Alzheimer¹¹ y el melanoma,¹⁴ entre otras

enfermedades y es muy usada para el desarrollo de vacunas genéticas.^{103,104}

CONCLUSIÓN

El campo de la salud es definitivamente uno de los más beneficiados con el desarrollo de la biología molecular. En particular, la TG se muestra como una de las opciones terapéuticas que puede revolucionar la forma tradicional de tratar muchas enfermedades en el presente siglo.

La actividad clínica cotidiana hace que el médico generalista deba actualizar permanentemente sus conocimientos sobre los fármacos clásicos y sus vías convencionales de administración, pero este nuevo panorama obligará también a familiarizarse con los nuevos “fármacos de ácidos nucleicos”, como plásmidos, aptámeros, ribozimas y ARN de interferencia, así como con las novedosas vías de administración de estos fármacos, que ofrecen nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de muchas patologías. ■

Agradecimientos

Al Dr. Diego J. Rodríguez Gil, Facultad de Medicina de la Universidad Yale, New Haven, CT, EE.UU.) por la lectura crítica del manuscrito y por sus oportunas sugerencias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leslie L, Rappo P, Abelson H, Jenkins RR, et al. Final Report of the FOPE II Pediatric Generalists of the Future Workgroup. *Pediatrics* 2000; 106(5):1199-223.
2. Lever AML. Terapia génica. En: Cox TM, Sinclair J. *Biología molecular en medicina*. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1998:Págs.304-19.
3. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256(5058):808-13.
4. Crooke ST. An overview of progress in antisense therapeutics. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998; 8(2):115-22.
5. Stull RA, Szoka FC Jr. Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: Progress and prospects. *Pharm. Res* 1995; 12(4):465-83.
6. Patil SD, Rodhes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7(1):E61-77.
7. Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44(2-3):153-66.
8. Ziello JE, Huang Y, Jovin IS. Cellular endocytosis and gene delivery. *Mol Med* 2010; 16(5-6):222-9.
9. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; 392(6679 Suppl):25-30.
10. Baekelandt V, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2(5):540-54.
11. Qu BX, Lambracht-Washington D, Fu M, Eagar TN, et al. Analysis of three plasmid systems for use in DNA A beta 42 immunization as therapy for Alzheimer's disease. *Vaccine* 2010; 28(32):5280-7.
12. Galanis E, Russell S. Cancer gene therapy clinical trials: Lessons for the future. *Br J Cancer* 2001; 85(10):1432-6.

13. Guinn BA, Mulherkar R. International progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2008; 15(12):765-75.
14. Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther* 2010; 10(4):312-7.
15. Johnston SA, Talaat AM, McGuire MJ. Genetic Immunization What's in a name? *Arch Med Res* 2002; 33(4):325-9.
16. Stull RA, Szoka FC Jr. Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res* 1995; 12(4):465-83.
17. Suess B, Weigand JE. Aptamers as artificial gene regulation elements. *Methods Mol Biol* 2009; 535:201-8.
18. Jayasena SD. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999; 45(9):1628-50.
19. Gilch S, Schätzl HM. Aptamers against prion proteins and prions. *Cell Mol. Life Sci* 2009; 66(15):2445-55.
20. Thompson AJ, Patel K. Antisense inhibitors, ribozymes, and siRNAs. *Clin Liver Dis* 2009; 13(3):375-90.
21. Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, et al. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther* 2008; 16(8):1481-9.
22. Zhang W, Ke W, Wu SS, Gan L, et al. An adenovirus-delivered peptide aptamer C1-1 targeting the core protein of hepatitis B virus inhibits viral DNA replication and production in vitro and in vivo. *Peptides* 2009; 30(10):1816-21.
23. Apte RS. Pegaptanib sodium for the treatment of age-related macular degeneration. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(3):499-508.
24. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489(1):31-44.
25. Akhtar S, Hughes MD, Khan A, Bibby M, et al. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44(1):3-21.
26. Liu C, Wu X, Luo C, Hu Z, et al. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29(1):63-70.
27. Chen L, Zhu Y, Li H, Wang GL, et al. Knockdown of TSPAN1 by RNA silencing and antisense technique inhibits proliferation and infiltration of human skin squamous carcinoma cells. *Tumori* 2010; 96(2):289-95.
28. Mardan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(5):715-58.
29. Burghes HA, McGovern VL. Antisense oligonucleotides and spinal muscular atrophy: skipping along. *Genes Dev* 2010; 24(15):1574-9.
30. Azad RF, Driver VB, Tanaka K, Cooke RM, et al. Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to RNA of the human cytomegalovirus major immediate-early region. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(9):1945-54.
31. Alt M, Renz R, Hofschneider PH, Paumgartner G, et al. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology* 1995; 22(3):707-17.
32. Tonkinson JL, Stein CA. Antisense oligodeoxynucleotides as clinical therapeutic agents. *Cancer Invest* 1996; 14(1):54-65.
33. Rosenberg SA, Blaese RM, Brenner MK, Deisseroth AB, et al. Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum Gene Ther* 2000; 11(6):919-79.
34. Mastroiannopoulos NP, Uney JB, Phylactou LA. The application of ribozymes and DNazymes in muscle and brain. *Molecules* 2010; 15(8):5460-72.
35. Wang CX, Lu YQ, Qi P, Chen LH, et al. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by hepatitis delta virus ribozymes delivered by targeting retrovirus. *Virology* 2010; 7:61-6.
36. Bai Y, Li H, Vu GP, Gong H, et al. Salmonella-mediated delivery of RNase P-based ribozymes for inhibition of viral gene expression and replication in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(16):7269-74.
37. Cavnari BM. Animales transgénicos: usos y limitaciones en la medicina del siglo XXI. *Arch Argent Pediatr* 2010; 108(4):343-9.
38. Mansfield SG, Kole J, Puttaraju M, Yang CC, et al. Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther* 2000; 7(22):1885-95.
39. Liu X, Luo M, Zhang LN, Yan Z, et al. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* 2005; 16(9):1116-23.
40. Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, Hirianna S, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* 2003; 9(8):1015-9.
41. Rodríguez-Martín T, Anthony K, García-Blanco MA, Mansfield SG, et al. Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Hum Mol Genet* 2009; 18(17):3266-73.
42. Tenenhaus Dann C. New technology for an old favorite: lentiviral transgenesis and RNAi in rats. *Transgenic Res* 2007; 16:571-80.
43. Márquez RT, McCaffrey AP. Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. *Hum Gene Ther* 2008; 19(1):27-38.
44. Tomar RS, Matta H, Chaudhary PM. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* 2003; 22(36):5712-5.
45. Spelios M, Kearns M, Savva M. From gene delivery to gene silencing: plasmid DNA-transfecting cationic lipid 1,3-dimyristoylamidopropane-2-[bis(2-dimethylamino-ethane)] carbamate efficiently promotes small interfering RNA-induced RNA interference. *Biochemistry* 2010; 49(27):5753-9.
46. García-Aragoncillo E, Hernández-Alcoceba R. Design of virotherapy for effective tumor treatment. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12(4):403-11.
47. Lotze MT, Kost TA. Viruses as gene delivery vectors: Application to gene function, target validation, and assay development. *Cancer Gene Ther* 2002; 9(8):692-9.
48. Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52(3):153-64.
49. Mah C, Byrne BJ, Flotte TR. Virus-based gene delivery systems. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(12):901-11.
50. Chamberlain JS. Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2002; 11(20):2355-62.
51. Green NK, Seymour LW. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther* 2002; 9(12):1036-42.
52. Lemiale F, Korokhov N. Lentiviral vectors for HIV disease prevention and treatment. *Vaccine* 2009; 27(25-26):3443-9.
53. McTaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv* 2002; 20(1):1-31.
54. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259):263-7.
55. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994; 68(1):510-6.
56. Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, et al. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immunodeficiency caused

- by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 1998; 91(1):30-6.
57. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995; 270(5235):470-5.
 58. Tait DL, Obermiller PS, Hatmaker AR, Redlin-Frazier S, et al. Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin Cancer Res* 1999; 5(7):1708-14.
 59. Fujii S, Huang S, Fong TC, Ando D, et al. Induction of melanoma-associated antigen systemic immunity upon intratumoral delivery of interferon-gamma retroviral vector in melanoma patients. *Cancer Gene Ther* 2000; 7(9):1220-30.
 60. Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, Barton NW, et al. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: In vivo detection of transduced cells without myeloblastation. *Hum Gene Ther* 1998; 9(17):2629-40.
 61. Lowenstein PR, Morrison EE, Bain D, Hodge P, et al. Use of recombinant vectors derived from herpes simplex virus 1 mutant tsK for short-term expression of transgenes encoding cytoplasmic and membrane anchored proteins in post mitotic-polarized cortical neurons and glial cells in vitro. *Neuroscience* 1994; 60(4):1059-77.
 62. Carpenter DE, Stevens JG. Long term expression of a foreign gene from a unique position in the latent herpes simplex virus genome. *Hum Gene Ther* 1996; 7(12):1447-54.
 63. Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, Bailey DJ, et al. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: Results of a phase I clinical trial. *Gene Ther* 1999; 6(3):350-63.
 64. Álvarez RD, Gómez-Navarro J, Wang M, Barnes MN, et al. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther* 2000; 2(5):524-30.
 65. Mohler ER 3rd, Rajagopalan S, Olin JW, Trachtenberg JD, et al. Adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor in critical limb ischemia: safety results from a phase I trial. *Vasc Med* 2003; 8(1):9-13.
 66. Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108(16):1933-8.
 67. Wohlfahrt ME, Beard BC, Lieber A, Kiem HP. A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL Leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models. *Cancer Res* 2007; 67(18):8783-90.
 68. Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002; 28(2):267-75.
 69. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 1997; 3(3):306-12.
 70. Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, Heald AE, et al. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a twopart clinical study. *Hum Gene Ther* 2003; 14(11):1079-88.
 71. Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 2005; 16(5):541-50.
 72. Dewa T, Asai T, Tsunoda Y, Kato K, et al. Liposomal polyamine-dialkyl phosphate conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity. *Bioconjug Chem* 2010; 21(5):844-52.
 73. Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, et al. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1995; 1(1):39-46.
 74. Tu Y, Kim JS. Selective gene transfer to hepatocellular carcinoma using homing peptide-grafted cationic liposomes. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20(4):821-7.
 75. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biological activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23):11307-11.
 76. He ZY, Zheng X, Wu XH, Song XR, et al. Development of glycyrrhetic acid-modified stealth cationic liposomes for gene delivery. *Int J Pharm* 2010; 397(1-2):147-54.
 77. Li J, Li X, Zhang Y, Zhou XK, et al. Gene therapy for psoriasis in the K14-VEGF transgenic mouse model by topical transdermal delivery of interleukin-4 using ultradeformable cationic liposome. *J Gene Med* 2010; 12(6):481-90.
 78. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, et al. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:735349.
 79. Park JW, Hong K, Carter P, Asgari H, et al. Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(5):1327-31.
 80. Lemkine GF, Demeneix BA. Polyethylenimins for in vivo gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3(2):178-82.
 81. Aramaki Y, Lee I, Arima H, Sakamoto T, et al. Efficient gene transfer to hepatoblastoma cells through asialoglycoprotein receptor and expression under the control of the cyclin A promoter. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(3):357-60.
 82. Gómez-Valadés AG, Molas M, Vidal-Alabro A, Bermúdez J, et al. Copolymers of poly-L-lysine with serine and tryptophan form stable DNA vectors: implications for receptor-mediated gene transfer. *J Control Release* 2005; 102(1):277-91.
 83. Lollo CP, Banaszczuk MG, Mullen PM, Coffin CC, et al. Poly-L-lysine based gene delivery systems: synthesis, purification, and application. *Methods Mol Med* 2002; 69:1-13.
 84. Lemkine GF, Demeneix BA. Polyethylenimins for in vivo gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3(2):178-82.
 85. Veiseh O, Kievit FM, Fang C, Mu N, et al. Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery. *Biomaterials* 2010; 31(31):8032-8042.
 86. Castellani S, Di Gioia S, Trotta T, Maffione AB, et al. Impact of lentiviral vector-mediated transduction on the tightness of a polarized model of airway epithelium and effect of cationic polymer polyethylenimine. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:1-11.
 87. Schäfer J, Höbel S, Bakowsky U, Aigner A. Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. *Biomaterials* 2010; 31(26):6892-900.
 88. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52(2):145-50.
 89. Klausner EA, Zhang Z, Chapman RL, Multack RF, et al. Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer. *Biomaterials* 2010; 31(7):1814-20.
 90. Gao JQ, Zhao QQ, Lv TF, Shuai WP, et al. Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. *Int J Pharm* 2010; 387(1-2):286-94.
 91. Xu Q, Wang CH, Pack DW. Polymeric carriers for gene delivery: chitosan and poly (amidoamine) dendrimers. *Curr Pharm Des* 2010; 16(21):2350-68.
 92. Vos JM. Therapeutic mammalian artificial episomal chromosomes. *Curr Opin Mol Ther* 1999; 1(2):204-15.
 93. Wong SP, Argyros O, Coutelle C, Harbottle RP. Strategies for the episomal modification of cells. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11(4):433-41.

94. Macnab S, Whitehouse A. Progress and prospects: human artificial chromosomes. *Gene Ther* 2009; 16(10):1180-8.
95. Kinoshita Y, Kamitani H, Mamun MH, Wasita B, et al. A gene delivery system with a human artificial chromosome vector based on migration of mesenchymal stem cells towards human glioblastoma HTB14 cells. *Neurol Res* 2010; 32(4):429-37.
96. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, et al. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2010; 18(2):386-93.
97. Li SD, Chen YC, Hackett MJ, Huang L. Tumor-targeted delivery of siRNA by self assembled nanoparticles. *Mol Ther* 2008; 16(1):163-9.
98. Mann MJ, Gibbons GH, Hutchinson H, Poston RS, et al. Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11):6411-6.
99. Nakamura M, Dávila-Zavala P, Tokuda H, Takakura Y, et al. Uptake and gene expression of naked plasmid DNA in cultured brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(1):235-39.
100. Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, et al. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11):6417-22.
101. Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, et al. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; 16(2):168-71.
102. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247(4949 Pt 1):1465-8.
103. Best SR, Peng S, Juang CM, Hung CF, et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine* 2009; 27(40):5450-9.
104. Huang HN, Li TL, Chan YL, Chen CL, et al. Transdermal immunization with low-pressure-gene-gun mediated chitosan-based DNA vaccines against Japanese encephalitis virus. *Biomaterials* 2009; 30(30):6017-25.

*Todas las ciencias exactas están regidas
por el principio de la aproximación.*

Bertrand Russel