

# Terapia génica con vectores virales para el tratamiento de mucopolisacaridosis y otras enfermedades genéticas

Homero Sáenz\*, \*\*  
Mónica Alexandra Gutiérrez\*  
Luis Alejandro Barrera\*

## RESUMEN

La terapia génica consiste en la inserción de DNA *in vivo o ex vivo*, en las células de una persona con fines terapéuticos. Inicialmente se propuso para el tratamiento de desórdenes monogénicos, pero posteriormente se extendió su uso para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades infecciosas como el sida. La eficacia y riesgos de la terapia génica dependen de los vehículos o vectores que se usan para introducir el material genético en las células que se quieren tratar. En este artículo se revisa el estado actual del uso de los vectores construidos usando virus, sus riesgos, ventajas y limitaciones para el tratamiento de uno de los grupos de enfermedades en que más se ha avanzado en la terapia génica, las mucopolisacaridosis (MPS), enfermedades de depósito lisosomal para las cuales no hay una terapia que prevenga la aparición de los síntomas o detenga el curso de la enfermedad y cuyo manejo es simplemente sintomático.

**Palabras clave:** terapia génica, vectores virales, mucopolisacaridosis, transferencia génica, enfermedades lisosomales, enfermedades genéticas, errores innatos del metabolismo.

## ABSTRACT

Gene therapy is the insertion of DNA *in vivo or ex vivo* in the cells of a person for therapeutic purposes. Initially this technique was proposed for the treatment of monogenic diseases, but then its use was extended to other diseases such as Cancer and AIDS. The efficacy and safety of the gene therapy depends mainly on the construction of vectors to deliver genetic material inside the cells to be treated. In this article we review the generalities of the technique with special emphasis in the different types of vectors that have been used for the treatment of the

**mucopolysaccharide storage disease (MPS), a group of lysosomal storage disorders for which there is not an effective therapy to stop the onset, or prevent the progression of the disease and their management is essentially symptomatic**

**Key words:** Gene therapy, viral vectors, mucopolysaccharidosis, gene transfer, lysosomal diseases, genetic diseases, inborn errors of metabolism.

## INTRODUCCIÓN

La terapia génica, es una alternativa muy promisoría para el manejo clínico de enfermedades hasta ahora incurables como la fibrosis quística, la inmunodeficiencia severa, el cáncer o el sida. Hasta el momento se han tratado más de cien enfermedades distintas y hay algo más de 4.000 pacientes en el mundo que portan en sus células DNA “no propio”.

La terapia génica comprende el aislamiento del DNA, la construcción de vectores o transportadores del DNA y la transfección de las células con esos vectores, en las cuales se quiere dejar el DNA exógeno, lo cual se puede hacer por métodos físicos, químicos o usando virus que es la técnica más empleada. Se han desarrollado diferentes clases de vectores derivados de virus como los retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus.

\* Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

\*\* Decanato de medicina, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, Venezuela.

Las mucopolisacaridosis (MPS), son siete de las cerca de cincuenta enfermedades de depósito lisosomal, caracterizadas porque los pacientes presentan acumulación de mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos (GAGs) en los lisosomas de las células afectadas y un aumento en la excreción urinaria de uno o varios GAGs. De estas enfermedades cinco están asociadas con retardo mental.

En este artículo se presenta el estado actual del conocimiento en cuanto al desarrollo de vectores de transferencia génica con fines clínicos usando como modelo seis de las MPS, las enfermedades de Hurler (MPS I), Hunter (MPS II), Sanfilippo B (MPS IIIB), Morquio A (MPS IVA), Maroteaux Lamy (MPS VI) y Sly (MPS VII). Se discuten las generalidades, las diferen-

tes formas de mediar la transferencia de genes terapéuticos, la distribución del producto génico y las ventajas y limitaciones de cada uno de los vectores virales empleados hasta ahora.

## MUCOPOLISACARIDOSIS

Las mucopolisacaridosis son enfermedades de depósito lisosomal, caracterizadas por la deficiencia de una de las 11 enzimas que participan en el catabolismo de los GAGs. El defecto molecular se traduce en acumulación de GAGs no degradados o parcialmente metabolizados, en las células de los tejidos afectados y excreción aumentada de los GAGs en orina. Dependiendo de la deficiencia enzimática, las mucopolisacaridosis se clasifican en siete tipos (1) (tabla 1).

**Tabla 1**  
**Clasificación de las mucopolisacaridosis (MPS)<sup>1</sup>**

MPS	Epónimo	Enzima deficiente	GAGs acumulados	Manifestaciones clínicas
Tipo IH	Hurler	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y heparán sulfato	Opacidad corneal Disostosis múltiple Organomegalia Enfermedad cardíaca Muerte en infancia
Tipo IS	Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y heparán sulfato	Opacidad corneal Rigidez articular Inteligencia normal
Tipo IH/S	Hurler/Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y heparán sulfato	Fenotipo intermedio entre IH y IS
Tipo II	Hunter (leve)	Iduronato sulfatasa (IDS)	Dermatán y heparán sulfato	Inteligencia normal Corta estatura Supervivencia 20-60 años
Tipo II	Hunter (severa)	Iduronato sulfatasa (IDS)	Dermatán y heparán sulfato	Disostosis múltiple Organomegalia Muerte antes de 15 años
Tipo IIIA	Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa (Sulfamidasa)	Heparán sulfato	Deterioro mental profundo. Hiperactividad. Manifestaciones somáticas medias.
Tipo IIIB	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetil glucosaminidasa	Heparán sulfato	Fenotipo similar a IIIA
Tipo IIIC	Sanfilippo C	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosamida acetiltransferasa	Heparán sulfato	Fenotipo similar a IIIA
Tipo IIID	Sanfilippo D	N-acetil glucosamina 6 sulfatasa	Heparán sulfato	Fenotipo similar a IIIA
Tipo IVA	Morquio A	N-acetil galactosamina 6 sulfatasa (GALNS)	Queratán y condroitín sulfato	Deformidades esqueléticas Hipoplasia odontoide Opacidad corneal
Tipo IVB	Morquio B	$\beta$ -galactosidasa	Queratán sulfato	Espectro de severidad similar a IVA
Tipo V	No existe			
Tipo VI	Maroteaux Lamy	Arilsulfatasa B	Dermatán sulfato	Disostosis múltiple Opacidad corneal Inteligencia normal Supervivencia hasta 15 años en las formas severas
Tipo VII	Sly	$\beta$ -glucuronidasa (GUSB)	Dermatán, heparán y condroitín sulfato	Disostosis múltiple Hepatoesplenomegalia Amplio espectro de severidad incluyendo hidrops fetal
Tipo VIII	No existe			
Tipo IX	—	Hialuronidasa	Hialuronidato	

1 Adaptada de Neufeld, EF, Muenzer, J. Mucopolysaccharidosis in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D (eds). 8<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill. New York, 2001.

Hasta el momento no existe un tratamiento definitivo para estas entidades y el manejo clínico actual, está dirigido a corregir algunas manifestaciones clínicas mediante cirugías ortopédicas, terapia física y cirugías oculares reparativas. Las investigaciones iniciales se enfocaron a desarrollar una terapia de remplazo enzimático mediante infusión de plasma normal, pero esta metodología resultó muy costosa e inconveniente[2,3]. Otra alternativa terapéutica usada son los trasplantes. Desde 1981, más de 220 pacientes con MPS se han sometido a trasplante alogénico de médula ósea o de células madre pluripotentes. La poca disponibilidad de donantes, las implicaciones inmunológicas, el riesgo potencial de enfermedades infectocontagiosas y los altos costos han sido los principales limitantes para el uso de esta terapia. Existe además una alta tasa de mortalidad (20-50%) y algunos estudios han demostrado que no se logra prevenir la progresión neurológica en las MPS que tienen compromiso del sistema nervioso central (SNC)[3,4].

A nivel mundial todos los esfuerzos de los grupos que hacen investigación en esta área, están centrados en desarrollar nuevas metodologías terapéuticas que puedan ser instauradas tempranamente en la vida del afectado. En este sentido, la terapia génica emerge como una de las posibilidades terapéuticas más promisorias.

## GENERALIDADES DE LA TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en el empleo de métodos terapéuticos mediante los cuales se introduce material genético exógeno, en las células adecuadas, para el tratamiento de enfermedades genéticas o infecciosas[5-8]. La transferencia génica se puede hacer tanto a células somáticas, como a células germinales[8]. Se pueden emplear estrategias terapéuticas no virales y virales[5,7,9,10]. Dentro de las primeras podemos encontrar el empleo de polímeros catiónicos, microbalística, células encapsuladas en polímeros[11], liposomas[12], microcromosomas y oligonucleótidos antisentido[13-15]. Varios tipos de virus incluyendo retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus, lentivirus y virus adenoasociados, han sido modificados en el laboratorio para poderlos aplicar en terapia génica[7].

Aunque los primeros planteamientos sobre terapia génica se remontan a la década de los setenta, es sólo hasta 1990 cuando dos pacientes con inmunodeficiencia combinada severa se sometieron a un protocolo de terapia génica, el cual utilizó un vector retroviral para mediar la transferencia, a linfocitos T, de la información genética que codifica para la adenosina deaminasa (ADA)[16]. Desde entonces, la aplicación de terapia génica ha venido en aumento y a la fecha hay aproximadamente 4.000 pacientes que tienen en su genoma genes exógenos.

En el caso de las MPS, aún no se han tratado pacientes por terapia génica. Sin embargo, se han adelantado estudios *in vitro* y en animales de experimentación, conducentes a establecer protocolos de transferencia génica para estas enfermedades.

## APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DE LAS MUCOPOLISACARIDOSIS

En los últimos años se han desarrollado diferentes clases de vectores virales para las MPS (figura 1). Cabe resaltar que hasta la fecha, los vectores virales derivados de retrovirus han sido los más aplicados para estas enfermedades.

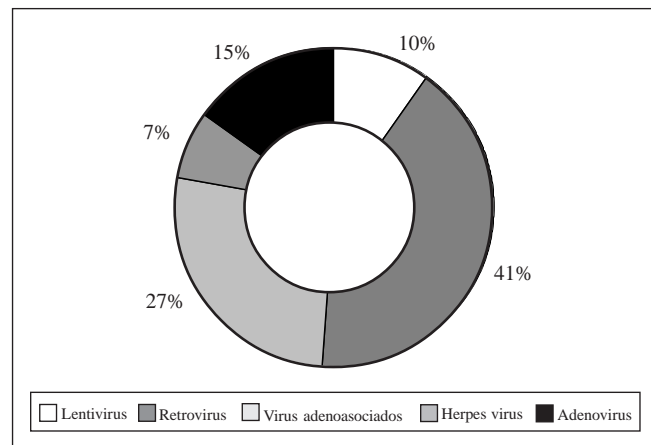


Figura 1. Vectores utilizados para transferencia génica en las mucopolisacaridosis. El diagrama representa, en porcentajes de un total 41 protocolos, los estudios realizados para el tratamiento de MPS utilizando vectores derivados de virus para mediar la transferencia génica. El gráfico fue elaborado a partir de la información recopilada en la revisión bibliográfica.

Aunque las MPS ha sido uno de los grupos de las enfermedades metabólicas más estudiado para el desarrollo de modelos de terapia génica, la investigación en todas las MPS no ha marchado al mismo ritmo. En los tipos VII (71%) e I (12%), se ha realizado el mayor número de investigaciones, mientras que para las MPS IVB, IIIA, IIIC (figura 2) no existen publicaciones.

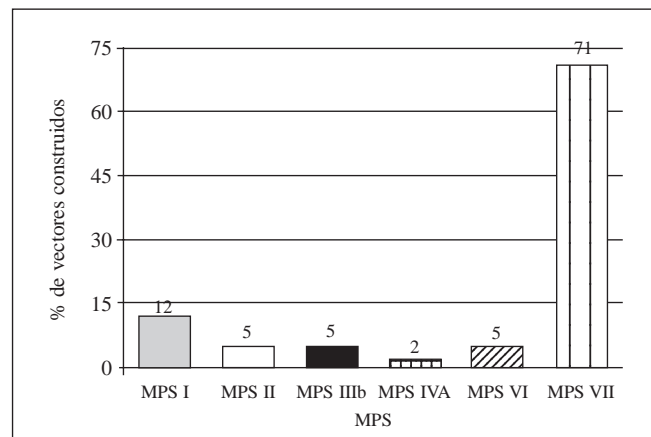


Figura 2. Ensayos en curso para el tratamiento de mucopolisacaridosis por terapia génica utilizando vectores virales. El gráfico representa, en porcentajes de un total 41 protocolos, los estudios de diseño, desarrollo y evaluación de vectores virales para el tratamiento de las mucopolisacaridosis. Enfermedades de Hurler (MPS I), Hunter (MPS II), Sanfilipo B (MPS III B), Morquio A (MPS IVA), Maroteaux Lamy (MPS VI) y Sly (MPS VII). El gráfico fue elaborado a partir de la información obtenida en la revisión de literatura.

### Vectores retrovirales

Los retrovirus poseen un genoma de aproximadamente 9.7 kb, constituido por una cadena de ARN. Se replican mediante la formación de una doble cadena de ADN (provirus) como intermediario. En el ciclo de vida del virus, existe una etapa obligatoria, en la cual la doble cadena de ADN se inserta en el genoma de la célula huésped (merced a las secuencias LTR del virus), llegando así a formar parte del material genético de la célula que infecta[17]. A los vectores retrovirales utilizados en terapia génica, se les elimina su capacidad de replicación al retirar del virus las secuencias gag, pol y env que codifican las proteínas del core, las responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos, es decir, transcriptasa reversa e integrasa y las componentes de la envoltura de la partícula viral, respectivamente[18,19]. Al genoma viral se le incorpora una nueva secuencia génica que contiene el gen terapéutico[20,21].

El vector retroviral, sin las secuencias gag, pol y env, se amplifica en una línea celular especial (células empaquetadoras) que contienen en su genoma las secuencias necesarias para ello. El vector conteniendo el gen exógeno infecta a la célula blanco y una vez en el citoplasma, la transcriptasa reversa permite la síntesis de ADN a partir de ARN. El ADN sintetizado se integra al azar en el genoma de la célula infectada y el gen expresará el producto terapéutico[21].

Los vectores derivados de retrovirus han sido los más utilizados en los protocolos de terapia génica para las MPS, como se puede observar en la figura 1. Hasta la fecha se han desarrollado protocolos utilizando esta clase de vectores para las MPS I, II, IVA, VI y VII (figura 3).

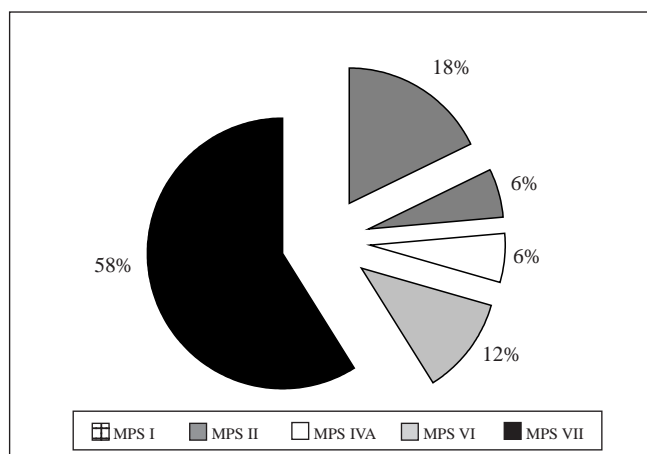


Figura 3. Estudios realizados en mucopolisacaridosis utilizando vectores retrovirales. La gráfica representa los porcentajes de un total de 17 protocolos, de vectores retrovirales desarrollados para el tratamiento de las enfermedades de Hurler, Hunter, Morquio A, Maroteaux Lammy y Sly. La gráfica fue elaborada a partir de la información recopilada en la revisión bibliográfica.

En la MPS I, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo*. Existen modelos caninos[22-24] y felino[24] para esta enfermedad, pero sólo en el canino se han realizado estudios de terapia génica. Baxter y colaboradores, lograron corregir el defecto enzimático en células madre pluripotentes provenientes de médula ósea y cuando se hicieron co-cultivos de las células modificadas con fibroblastos Hurler, éstos fueron capaces de endocitar la enzima activa liberada por las células modificadas[25]. Lutzkoc C. y colaboradores, realizaron trabajos en células hematopoyéticas, provenientes del modelo canino[26,27] e *in vitro* lograron obtener actividades enzimáticas entre 10 y 200 veces los valores normales, pero cuando las células modificadas fueron suministradas a animales de experimentación, la actividad enzimática detectada fue muy baja[26]. Otro estudio realizado por los mismos autores, no demostró expresión de la enzima en la progenie de los perros gestantes tratados[27]. Recientemente, Zheng y colaboradores evaluaron *in vivo* el trasplante de médula ósea normal y genéticamente modificada. En el primer caso después de seis meses, las cantidades de  $\alpha$ -L-iduronidasa eran bajas, en órganos como el hígado y el bazo, sin embargo, fueron suficientes para reducir los GAGs acumulados, hasta alcanzar niveles normales. Estos resultados, mejoraron cuando los animales fueron trasplantados con médula ósea modificada, ya que no sólo hubo corrección en bazo e hígado, sino que fue evidente en riñón y los niveles de expresión de la enzima fueron superiores[28].

Se han efectuado estudios para evaluar la transferencia génica mediada por el vector retroviral L2SN en células hematopoyéticas provenientes de pacientes con el síndrome de Hunter, logrando expresar la enzima con altos niveles de actividad (entre 10 y 70 veces el valor normal). También, se revertió el proceso de la enfermedad y disminuyeron las concentraciones de GAGs[3].

Toieta G. y colaboradores, construyeron el vector LGSN, para corregir la deficiencia enzimática en la MPS IVA[29]. Ellos evaluaron la expresión del cDNA de la N-acetilgalactosamina 6-sulfato (GALNS) en una línea celular linfoblastoide, linfocitos y queratinocitos humanos, mioblastos murinos y sinoviocitos de conejo. Co-cultivos de estas células con fibroblastos humanos deficientes de la enzima mostraron corrección del defecto enzimático y reducción de los GAGs acumulados[29].

A nivel mundial, sólo Yogalingam y colaboradores, se han dedicado a trabajar en la enfermedad de Maroteaux Lamy en la cual no hay compromiso del sistema nervioso central. Las investigaciones sólo se han enfocado a desarrollar vectores retrovirales para probarlos en un modelo felino[30,31]. Los resultados de estos estudios no han sido muy alentadores, ya que no se logró obtener niveles enzimáticos altos y estables en los animales a los que se les implantó en la región subcapsular del riñón, fibroblastos modificados. Los niveles

de arilsulfatasa B disminuyeron gradualmente a partir de los 20 días postimplantación[31].

El síndrome de Sly, es una de las MPS más estudiada desde el punto de vista bioquímico y molecular. Producto de lo anterior, existe un gran número de trabajos reportados en el tratamiento de esta enfermedad mediante la transferencia génica *in vitro* e *in vivo*. Si bien es cierto que para la MPS VII se han descrito tres modelos animales: murino[32], felino[33] y canino[34], en las investigaciones con vectores retrovirales, la mayoría de los trabajos se han realizado en ratones y muy pocos en el modelo canino. Los protocolos ensayados hasta el momento se han basado en: infusión intravenosa de macrófagos genéticamente modificados[35], inyección intravenosa de partículas virales recombinantes[36,37], implantes cerebral y en cavidad peritoneal de fibroblastos corregidos[38,39] y trasplante en útero de células hepáticas fetales corregidas[40]. Se ha logrado expresar eficientemente la  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) en cerebro[36,38], hígado[37], bazo, riñón, esternón, pulmón y corazón[35,36,40]. Los datos muestran que mediante la inyección intravenosa de estos vectores es posible dirigir y expresar la enzima en diferentes órganos, incluso, en el cerebro, en donde se detectó actividad enzimática.

### Vectores derivados del virus herpes simple

El virus herpes simple tipo I (HSV-1) tiene un genoma lineal de doble cadena de ADN de 152 kb[41,42], es neurotrópico y se ha utilizado para mediar la transferencia génica al sistema nervioso[43,44]. El HSV-1 nativo es capaz de infectar neuronas y hace ciclo lítico o permanece en estado latente como episoma intranuclear[45], en ese estado es transcripcionalmente silencioso. Los que se utilizan como vectores tienen promotores específicos que les permiten funcionar durante el estado de latencia[46,47].

Estos vectores no han sido muy usados para el tratamiento de las MPS. Solamente existen tres reportes de ensayos de transferencia utilizando estos vectores y las investigaciones se han centrado en la MPS VII[48-50]. Los resultados tanto en el modelo murino [48,49], como en el canino [48] muestran evidencia de la expresión de GUSB en las células cercanas al sitio de inoculación, como por ejemplo en células retinales después de inoculación en la córnea[50] y en células del tálamo cuando la ruta de acceso fue inyección intracraneal[49].

### Vectores adenovirales

El genoma de los adenovirus está constituido por una doble cadena lineal de ADN[51] de aproximadamente 36 kb. Los serotipos 2 y 5 son los más utilizados para construir

vectores[10,52]. El genoma de los adenovirus se divide en genes tempranos (E1 a E4) y genes tardíos (L1 a L5). Puesto que la capacidad del genoma adenoviral para dirigir la producción de adenovirus reside en las secuencias ubicadas en E1, las estrategias para producir vectores adenovirales consisten en eliminar dichas secuencias e incorporar en su lugar el gen terapéutico, generando así un vector adenoviral sin capacidad de replicación[10,53]. La amplificación del vector se lleva a cabo utilizando una línea celular complementaria, conteniendo la secuencia E1 en su genoma[51]. Por último, el vector adenoviral conteniendo el gen exógeno se transfiere a la célula blanco. El ADN transferido permanece como un ADN episomal, dirigiendo la expresión del gen de interés[54,55].

En la MPS I, uno de los órganos afectados es la córnea, por esta razón Cashman y colaboradores trabajaron en la construcción de vectores adenovirales para la corrección en este órgano. Ellos demostraron que el Ad5/f37 en cultivo presenta una alta capacidad para infectar las células fotorreceptoras, puesto que en dichas células se expresa el receptor de coxsackie-adenovirus[52], el cual reconoce los residuos de ácido siálico presentes en la fibra del pentón de los adenovirus y el vector a su vez muestra una alta afinidad por ese receptor[56]. Para la corrección de la iduronato 2 sulfatasa en el síndrome de Hunter mediante el uso de vectores adenovirales, Di Francesco y colaboradores han llegado hasta experimentación *in vitro*[57] y no existen reportes de estudios *in vivo*.

Los reportes restantes encontrados en la literatura, corresponden a estudios realizados para el tratamiento de MPS VII *in vitro* e *in vivo* utilizando ratones y perros[58-60] como modelos biológicos. Los resultados de dichos trabajos han mostrado expresión por corto tiempo, posiblemente debido a la respuesta inmune del sujeto a los vectores. Para los ensayos ejecutados *in vivo* la vía de inoculación ha sido directamente el órgano blanco (ojo, cerebro) y sólo se detectó expresión de la enzima en las células tratadas y vecinas[60,61].

### Vectores derivados de virus adenoasociados (AAV)

Los viriones de los AAV tienen una cadena sencilla de ADN lineal[62,63] y el genoma está constituido por dos secuencias invertidas repetidas (ITR), flanqueando las secuencias codificantes para las proteínas de replicación (Rep) y capsido (Cap). Cuando los AAV se utilizan como vectores, los genes Rep y Cap se remplazan por el transgen y por sus secuencias reguladoras asociadas[62,64]. La longitud total del inserto no puede exceder 4.7 kb, por lo que la capacidad de empaquetamiento es limitada[7,62,65,66]. Los AAV no son patógenos para los humanos y producen una expresión estable de la información genética que se transfiere a las células[66]. Pueden infectar tanto células en división como interfásicas[63,64,67,68]. Estos virus son parvovirus que requieren para la replicación eficiente y producción de proge-

nie, la co-infección con virus ayudadores como adenovirus o virus herpes simple[62,69]. En ausencia del virus ayudador, el genoma del AAV se integra al de la célula hospedera[62], específicamente en el cromosoma 19 en q13.4[65,70].

La producción del vector recombinante requiere que Rep y Cap estén proporcionados en trans (no necesariamente tienen que ser suministrados en el mismo marco de lectura), junto con los productos del genoma del virus ayudador. El método convencional es co-transfectar con dos plásmidos, uno como vector ayudador y otro como vector de empaquetamiento (Rep y Cap), en la línea celular 293[65].

Investigaciones con diferentes sistemas basadas en vectores AAV se han utilizado principalmente para el manejo del Síndrome de Sly[71-78]. La administración de los vectores se ha realizado mediante diferentes rutas de inoculación buscando la vía más adecuada para llegar a todos los tejidos. Los reportes describen inoculación intravenosa[71,72,76,78], intramuscular[71,73], intracraneal dirigida a tálamo e hipotálamo de inyecciones de partículas virales recombinantes con el cDNA de GUSB en ratones con MPS VII[74,75,77]. Se han logrado obtener niveles terapéuticos de GUSB en las primeras semanas de edad en hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón, cerebro, músculo y retina. En todos los trabajos reportados, la expresión de la enzima ha persistido en la mayoría de los órganos por largo tiempo, que varía entre 16 y 24 meses, en niveles suficientes para reducir y prevenir completamente el almacenamiento lisosomal. En neuronas, microglia y meninges del SNC también se ha observado el mismo efecto.

Se demostró que en ratones tratados empleando la ruta intravenosa, hubo acceso de los AAV recombinantes al SNC, evitando métodos más invasivos como la inyección intracraneal, la cual sólo permite una expresión limitada en la región cercana a la inoculación[71,73,76,78].

Los resultados obtenidos sugieren que la transferencia génica mediada por AAV puede lograr niveles terapéuticamente relevantes de la enzima, en las etapas tempranas de la vida y el crecimiento y diferenciación rápida de los tejidos no limita la expresión a largo plazo[72]. Otros grupos de investigación que trabajan en MPS I[79] y MPS IIIB[80], están empleando esta clase de vectores. Los trabajos en estas dos entidades no están tan adelantados como en las MPS VII y I y sólo se han realizado estudios *in vitro* con fibroblastos provenientes de pacientes con síndrome de Hurler, en los cuales la expresión, con niveles entre 50 y 140 veces los normales, se mantuvo por seis semanas, tiempo que duró el estudio[79]. Empleando un modelo murino para la MPS IIIB, después de inyección intracraneal, hubo expresión localizada de la  $\alpha$ -N-acetil glucosaminidasa y disminución de GAGs acumulados en cerebro[80].

## Perspectivas

Debido a que cada vector tiene ventajas y limitaciones específicas, cada cual tiene sus propias aplicaciones. Los vectores retrovirales pueden integrarse permanentemente en el genoma de la célula infectada, pero requieren células en división mitótica para la transducción. Los vectores adenovirales pueden entregar genes eficientemente a una gran variedad de células en división e interfásicas, lo cual ha sido ampliamente demostrado en los últimos 15 años, sin embargo, la respuesta inmunológica de las células infectadas limita la expresión *in vivo*. Los vectores derivados del herpes simple pueden hacer transferencia de grandes insertos de ADN exógeno y presentan tropismo por neuronas, de ahí que se haya pensado en éstos para emplearlos como vectores en terapia de enfermedades neurológicas, sin embargo, la inmunogenicidad del transgen genera ciertos inconvenientes. Aunque los AAV pueden infectar diferentes tipos de células (división e interfásicas), tienen como desventaja que el tamaño de ADN exógeno transferido es muy pequeño.

En la actualidad hay vectores derivados de retrovirus, adenovirus y AAV que ya están siendo evaluados en ensayos clínicos -Fase I-, para el tratamiento de la inmunodeficiencia severa combinada, fibrosis quística, enfermedad de Gaucher, algunas aminoacidopatías como la fenilcetonuria, tirosinemia tipo I, homocistinuria, deficiencia de ornitina transcarbamilasa y algunos tipos de cáncer[11], lo cual ha generado muchas expectativas para entidades como las mucopolisacaridosis y otras enfermedades genéticas, que no tienen un tratamiento definitivo.

No están del todo claros los mecanismos reguladores de la expresión de información genética transferida a las células huésped, pues no son totalmente conocidas las consecuencias del producto de las interacciones vector-huésped, de tal manera que no se tiene certeza de la influencia que pueda tener el ingreso de material génico extraño, pues dependiendo del lugar en que se inserte podría tener consecuencias no deseadas. Así por ejemplo, cuando se integre un gen corrector, pudiera interrumpirse un gen supresor de tumores generando entonces una neoplasia o por el contrario activar algún gen de diferenciación expresando aspectos morfofisiológicos no deseados. De hecho, recientemente en una cohorte de once pacientes tratados para inmunodeficiencia severa (SIDC), usando retrovirus uno desarrolló linfoma por lo cual como medida de precaución en los Estados Unidos se suspendieron los protocolos que emplean esos virus para reparar el defecto en células madres de médula ósea[81]. Sin embargo, el director encargado de la FDA, Philip Naguchie afirmó que “la terapia génica es un tratamiento promisorio para pacientes que no han respondido a otros tratamientos” y las investigaciones continúan para saber si se trató de un caso fortuito, si sólo se presenta en pacientes tratados con estos vectores

específicamente en esa enfermedad o si existen riesgos semejantes en otros casos. Sólo la profundización de investigaciones en diferentes tópicos de la terapia génica, permitirá la obtención de respuestas a interrogantes que a la luz del conocimiento actual, han llevado a que la aplicación de protocolos de terapia génica se haya visto limitada. Cuando los avances permitan la adecuada inserción y control del material genético en las células humanas, la terapia génica se convertirá en la alternativa para tratar enfermedades hasta ahora incurables. Mientras tanto son muy valiosos todos los aportes de los grupos que trabajan en el desarrollo de protocolos, pues con sus hallazgos se van construyendo los soportes científicos que permitirán, comprender los mecanismos de regulación de los genes, los sitios de inserción y lograr una expresión estable de los genes y sus productos, para en un futuro no muy lejano, ofrecer un tratamiento a personas para quienes hasta ahora no hay una alternativa para curar su enfermedad.

Con el fin de contribuir a la búsqueda de soluciones terapéuticas para enfermedades genéticas, desde hace algunos años el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana, ha enfocado parte de sus esfuerzos a la investigación en terapia génica y terapia de remplazo enzimática para enfermedades como las MPS. En lo que respecta a la terapia génica estamos adelantando estudios para los síndromes de Morquio A y Hunter. Se ha logrado avanzar en la construcción de casetes de expresión para la enzimas GALNS deficiente en los pacientes que sufren la enfermedad de Morquio A y la IDS deficiente en el síndrome de Hunter. Hemos logrado reparar *in vitro*, el defecto en células provenientes de un paciente con enfermedad de Hunter[82] y en la actualidad se está evaluando un AAV recombinante para corregir la deficiencia enzimática *in vitro* de la GALNS. El AAV se generó mediante un sistema novedoso de producción libre de adenovirus[83]. Se espera seguir profundizando en esta área para que en un mediano plazo podamos ofrecer a los pacientes con estas enfermedades una terapéutica duradera,

eficaz y segura en enfermedades que hasta ahora no tienen curación.

## GLOSARIO

**Casete de expresión:** Construcción genética artificial que contiene un gen que desea expresarse en una célula hospedera.

**Episomal:** Material genético autónomo localizado en el citoplasma.

**Plásmido:** Molécula de ADN circular de replicación autónoma, presente en el citoplasma de bacterias y algunas levaduras. Permite la inserción de fragmentos de ADN, lo cual los hace útiles para la transferencia de genes. Existen comercialmente plásmidos artificiales obtenidos por tecnología de ADN recombinante.

**Partícula viral recombinante:** Unidad estructural de un virus, la cual contiene insertado dentro de su genoma un gen exógeno.

**Tecnología del ADN recombinante:** Técnicas de biología molecular que permiten obtener moléculas de ADN con fragmentos de origen celular distintos.

**Transfección:** Proceso mediante el cual se transfiere material genético a una célula hospedera.

**Transgen:** Gen exógeno que es transferido a un modelo biológico en donde se desea expresar.

**Virus adenoasociados:** Tipo de virus ADN de cadena sencilla que requiere para su replicación coinfección con adenovirus o herpes virus.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Neufeld EF, Muenzer J. Mucopolysaccharidosis *in: The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D. (eds). McGraw-Hill. New York 2001; 3421-52.
2. DiFerrante NM, Nichols BL, Jr., Donnelly PV, Neri G, Hrgovic R, Berglund RK. *Induced degradation of glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's syndromes by plasma infusion*. Proc Nat Acad Sci. USA 1971; 68: 303-7.
3. Braun SE, Aranovich EL, Anderson RA, Crotty PL, McIvor RS, Whitley CB. *Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate -2- sulfatase*. Proc Natl Acad Sci. USA 1993; 90: 11830-4.
4. McKinnis EJ, Sulzbacher S, Rutledge JC, Sanders J, Scott CR. *Bone marrow transplantation in Hunter syndrome*. J Pediatr 1996; 129: 145-8.
5. Harris JD, Lemoine NR. *Strategies for targeted gene therapy*. Trends in Genet 1996; 12: 400-4.
6. Orkin L. *et al. Report and Recommendations of the Panel to Assess the NIH Investment in Research on Gene Therapy*. Distributed by the National Institutes of Health. Bethesda. MD. www.nih.gov. Dec. 07, 1995.
7. Smith AE. *Viral vectors in gene therapy*. Ann Rev Microbiol 1995; 49: 807-38.

SÁENZ H., GUTIÉRREZ M.A., BARRERA L.A. TERAPIA GÉNICA CON VECTORES VIRALES PARA EL TRATAMIENTO DE...

8. Verma IM, Somia N. *Gene therapy: promises, problems and prospects*. Nature 1997; 389: 239-42.
9. Jooss K, Yang Y, Wilson JM. *Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung*. Hum Gene Ther 1996; 7: 1555-66.
10. Sparer TE, Wynn SG, Clark DJ, Kaplan JM, Cardoza LM, Wadsworth SC, Smith AE, Gooding LR. *Generation of cytotoxic T lymphocytes against immunorecessive epitopes after multiple immunizations with adenovirus vectors is dependent on haplotype*. J Virol 1997; 71: 2277-84.
11. Templeton NS and Lasic D. *Gene therapy. Therapeutic mechanisms and strategies*. Marcel Dekker, Inc. New York 2000; 584 p.
12. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tasi YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL. *Enhanced gene delivery system and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations*. J Biol Chem 1994; 269: 2550-61.
13. Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML. *Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells*. Proc Natl Acad Sci. USA 1991; 88: 4255-9.
14. Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Soeun GH, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH. *A novel cationic lipid greatly enhances plasmid delivery and expression in mouse lung*. Proc Natl Acad Sci. USA 1996; 93: 11454-9.
15. Collins J, Herman P, Schuch C, Babgy G. *Cmyc antisense oligonucleotides inhibit the colony-forming capacity of Colo 320 colonic carcinoma cells*. J Clin Invest 1992; 89: 1523-7.
16. French AW. *Terapia génica. Investigación y ciencia*. 1995; 251: 61-5.
17. Rollins SA, Birks CW, Setter E, Squinto SP, Rother RP. *Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response*. Hum Gene Ther 1996; 7: 619-26.
18. Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, Kim S. *Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility*. J Virol 1998; 72: 994-1004.
19. Saleh M. *A retroviral vector that allows co-expression of two genes and the versatility of alternate selection markers*. Hum Gene Ther 1997; 8: 979-83.
20. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KMW, Putnam J, B, Schea R, Shi DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. *Retrovirus mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer*. Nature Medicine 1996; 2: 985-91.
21. Tait DL, Obermiller PS, Redlin-Frazier S, Jensen RA, Welch P, Dann J, King M, Johnson DH and Holt JT. *A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer*. Clin Cancer Res 1997; 3: 1959-68.
22. Shull RM, Munger RJ, Spellacy E, Hall CW, Constantopoulos G, Neufeld EF. *Canine  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency: a model of mucopolysaccharidosis I*. Am J Path 1982; 109: 244-8.
23. Spellacy E, Shull RM, Constantopoulos G, Neufeld EF. *A canine model of human  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency*. Proc Natl Acad Sci. USA 1983; 80: 6091-5.
24. Haskins ME, Jezyk PF, Desnick RJ, McDonough SK, Patterson DF.  *$\alpha$ -L-iduronidase deficiency in a cat: a model of mucopolysaccharidosis I*. Pediat Res 1979; 13: 1294-7.
25. Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GT, Church HJ, Wraith JE, Fairbairn LJ. *Retroviral mediated correction of bone marrow derived mesenchymal stem cell from patients with mucopolysaccharidosis type I*. Blood 2002; 99: 1857-9.
26. Lutzko C, Omori F, Abrams-Ogg AC, Shull R, Li L, Lau K, Ruedy C, Nanji S, Gartley C, Dobson H, Foster R, Kruth S, Dube ID. *Gene therapy for canine  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency: In utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease*. Hum Gene Ther 1999a; 10: 1521-32.
27. Lutzko C, Kruth S, Abrams-Ogg ACG, Lau K, Li L, Clark BR, Ruedy C, Nanji S, Foster R, Kohn D, Shull R. *Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility canine  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency*. Blood 1999b; 93: 1895-1905.
28. Zheng Y, Zhou J, Rozenfurt N, Ryazantsev S, Hua L, Kohn DB, Neufeld EF. *Treatment of the mouse model of MPS by transplantation of bone marrow and of genetically modified bone marrow*. Abstract. *Strategies for therapy of MPS and related diseases, UCLA, Sunset Village, June 21-24 2001*. [http://www.biolchem.ucla.edu/mps/01therapy/abstracts/ZhengY\\_Neufeld](http://www.biolchem.ucla.edu/mps/01therapy/abstracts/ZhengY_Neufeld).
29. Toietta G, Severini G.M, Traversari C, Tomatsu S, Sukegawa K, Fukuda S, Kondo N, Tortora P, Bordignon C. *Various cells retrovirally transduced with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase correct Morquio skin fibroblasts in vitro*. Hum Gene Ther 2001; 12: 2007-16.
30. Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, Anson DS. *Evaluation of fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI*. Biochim Biophys. Acta 1999a; 1453: 284-96.
31. Yogalingam G, Muller V, Hopwood JJ, Anson DS. *Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells*. DNA and Cell Biology 1999b; 18: 187-95.
32. Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B, Lyford KA, Maltais LM, Wawrzyniak CJ. *Murine mucopolysaccharidosis type VII: characterization of a mouse with  $\beta$ -glucuronidase deficiency*. J Clin Invest 1989; 83: 1258-66.
33. Gitzelmann R, Bosshard NU, Superti-Furga A, Spycher MA, Briner J, Wiesmann U, Lutz H, Litschi B. *Feline mucopolysaccharidosis VII due to  $\beta$ -glucuronidase deficiency*. Vet Path 1994. 31: 435-43.
34. Haskins ME, Desnick RJ, DiFerrante N, Jezyk PF, Patterson DF.  *$\beta$ -glucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII*. Pediat Res 1984; 18: 980-4.
35. Ohashi T, Yokoo T, Iizuka S, Kobayashi H, Sly WS, Eto Y. *Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII transplantation of normal and genetically modified macrophages*. Blood 2000; 5: 3631-3.
36. Gao C, Sands MS, Haskins ME, Parker PK. *Delivery of a retrovirus vector expressing human  $\beta$ -glucuronidase to the liver and the spleen decreases lysosomal storage in mucopolysaccharidosis VII mice*. Mol Ther 2000; 2: 233-44.
37. Xu L, Haskins ME, Melniececzek JR, Gao C, Weil MA, O'Malley TM, O'Donnell PA, Mazrier H, Ellinwood NM, Zweigle J, Wolfe JH, Ponder KP. *Transduction of hepatocytes after neonatal delivery of a moloney*

- murine leukemia virus based retroviral vector results in long-term expression of  $\beta$ -glucuronidase in mucopolysaccharidosis VII dogs.* Mol Ther 2002; 5: 141-53.
38. Taylor RM, Wolfe JH. *Decreases lysosomal storage in the adult MPS VII mouse brain in the vicinity of grafts of retroviral vector-corrected fibroblast secreting high levels of  $\beta$ -glucuronidase.* Nature Medicine 1997; 3: 771-4.
  39. Wolfe JH, Sands MS, Harel N, Weil MA, Parente MK, Polesky AC, Reilly JJ, Hasson C, Weimelt S, Haskins ME. *Gene transfer of low levels of  $\beta$ -glucuronidase corrects hepatic lysosomal storage in a large animal model of mucopolysaccharidosis VII.* Mol Ther 2000; 2: 552-61.
  40. Casal ML, Wolfe JH. *In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of  $\beta$ -glucuronidase can delay onset of clinical signs.* Blood 2001; 97: 1625-34.
  41. Wang S, Vos J. *A hybrid herpesvirus infectious vector based on epstein-barr virus and herpes simplex virus type 1 for gene transfer into human cells in vitro and in vivo.* J Virol 1996; 70: 8422-30.
  42. Wygoda MR, Wilson MR, Davis MA, Trosko JE, Rehemtulla A, Lawrence TS. *Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by stander cells: the good virus.* Proc Natl Acad Sci, USA 1997; 94: 5804-9.
  43. Kennedy PGE. *Potential uses of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders.* Brain 1997; 120: 1245-59.
  44. Wood MJA, Byrnes AP, Pfaff DW, Rabkin SD, Charlton HM. *Inflammatory effects of gene-transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors.* Gene Ther. 1994; 1: 283-91.
  45. Sawtell NM, Thompson RL. *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependant establishment and reactivation from latency.* J Virol 1992; 66: 2157-69.
  46. Miyatake S, Iyer A, Martuza RL, Rabkin SD. *Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell specific replication.* J Virol 1997; 71: 5124-32.
  47. Steiner I, Spivack JG, Lirette RP, Brown SM, MacLean AR, Subak-Sharpe JH, Fraser NW. *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection.* EMBO J 1989; 8: 505-11.
  48. Wolfe JH, Schuchman ED, Stramm LE, Concaugh EA, Haskins ME, Aguirre GD, Patterson DF, Desnick RJ, Gilboa E. *Herpesvirus vector gene transfer and expression of  $\beta$ -glucuronidase in the central nervous system of MPS VII mice.* Proc Natl Acad Sci, USA 1990; 87: 2877-81.
  49. Zhu J, Kang W, Wolfe JH, Fraser NW. *Significantly increased expression of  $\beta$ -glucuronidase in the central nervous system of mucopolysaccharidosis type VII mice from the latency-associated transcript promoter in a nonpathogenic herpes simplex virus type 1 vector.* Mol Ther 2000; 2: 82-9.
  50. Wolfe JH, Sands MS, Barker JE, Gwynn B, Rowe LB, Wogler CA, Birkenmeier EH. *Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer.* Nature Genetics 1992; 1: 379-84.
  51. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. *Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity.* Nature Genetics 1998; 18: 180-3.
  52. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones AE, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. *Isolation of a common receptor for coxsackie virus B viruses and adenoviruses 2 and 5.* Science 1997; 275: 1320-3.
  53. Gahry-Sdard H, Molinier-Frenkel V, Le Boulaire C, Saulnier P, Opolon P, Lengange R, Gautier E, Le Cesne A, Zitvogel L, Venet A, Schatz C, Courtney M, Le Chevalier T, Tursz T, Guillet J, Farace F. *Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer.* J Clin Invest 1997; 100: 2218-26.
  54. Shi Q, Wang Y, Worton R. *Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector.* Hum Gene Ther 1997; 8: 403-10.
  55. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. *Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalisation but not virus attachment.* Cell 1993; 73: 309-19.
  56. Cashman SM et al. *Characterization of retinal pathology in a mouse model of MPS type I and development of an adenoviral-mediated gene therapy.* Abstract. Strategies for therapy of MPS and related diseases; UCLA, Sunset Village, June 21-24, 2001. <http://www.biolchem.ucla.edu/mps/01therapy/abstracts/CashmanS>.
  57. DiFrancesco C, Cracco C, Tomanin R, Picci L, Ventura L, Zancchello E, Di Natale P, Anson DS, Hopwood JJ, Graham FL, Scarpa M. *In vitro correction of iduronate 2 sulfatase deficiency by adenovirus-mediated gene transfer.* Gene Ther 1997; 4: 442-8.
  58. Li T, Davidson BL. *Phenotype correction in retinal pigment epithelium in murine mucopolysaccharidosis VII by adenovirus-mediated gene tra.* Proc Natl Acad Sci. USA 1995; 92: 7700-4.
  59. Ohashi T, Watabe K, Uehara K, Sly WS, Vogler C, Eto Y. *Adenovirus mediated gene transfer and expression of human  $\beta$ -glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis.* Proc Natl Acad Sci. USA 1997; 94: 1287-92.
  60. Ghodsi A, Stein C, Derksen T, Martins I, Anderson RD, Davidson BL. *System hyperosmolality improves  $\beta$ -glucuronidase distribution and pathology in murine MPS VII brain following intraventricular gene transfer.* Exp Neurol 1999; 160: 109-16.
  61. Kamata Y, Okuyama T, Kosuga M, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, Yamada M, Azuma N. *Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII.* Mol Ther 2001; 4: 307-12.
  62. Fisher KJ, Kelley W M, Burda JF, Wilson J M. *A novel adenovirus-adenovirus associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome.* Hum Gene Ther 1996; 7: 2079-87.
  63. Rutledge EA, Russell DW. *Adeno-associated virus vector integration junctions.* J Virol 1997; 71: 8429-36.
  64. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM. *Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene delivery.* Nature Medicine 1997; 3: 306-16.
  65. Samulski RJ, Chang L, Shenk T. *Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression.* J Virol 1989. 63: 3822-8.
  66. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winter B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA. *Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors.* Nature Genetics 1997; 16: 270-5.

67. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski J. *Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adenoassociated virus (AAV) vector*. Brain Res 1996; 713: 99-107.
68. Xiao X, Li J, Samulski RJ. *Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus*. J Virol 1998; 72: 2224-32.
69. Vincent KA, Piraino ST, Wadsworth SC. *Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products*. J Virol 1997; 71: 1897-905.
70. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci. USA 1990; 87: 2211-15.
71. Watson GL, Sayles JN, Chen C, Elliger SS, Elliger CA, Raju NR, Kurtzman GJ, Podsakoff GM. *Treatment of lysosomal storage disease in MPS VII mice using a recombinant adeno-associated virus*. Gene Ther. 1998; 5: 1642-9.
72. Daly TM, Vogler C, Levy B, Haskins ME, Sands MS. *Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease*. Proc Natl Acad Sci. USA 1999a; 96: 2296-300.
73. Daly TM, Okuyama T, Vogler C, Haskins ME, Muzyczka N, Sands MS. *Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged  $\beta$ -glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII*. Hum Gene Ther 1999b; 10: 85-94.
74. Skrorupa AF, Fisher KJ, Wilson JM, Parente MK, Wolfe JH. *Sustained production of  $\beta$ -glucuronidase from localized sites after AAV vector gene transfer results in widespread distribution of enzyme and reversal of lysosomal storage lesions in a large volume of brain mucopolysaccharidosis*. Exp Neurol 1999; 160: 17-27.
75. Sferra TJ, Qu G, McNeely D, Rennard R, Clark KR, Lo WD, Johnson PR. *Recombinant adeno-associated virus mediated correction of lysosomal storage within the central nervous system of the adult mucopolysaccharidosis type VII*. Hum Gene Ther 2000; 11: 507-19.
76. Daly TM, Ohlemiller KK, Roberts MS, Vogler CA, Sands MS. *Prevention of systemic clinical diseases in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene*. Gene Ther 2001; 8: 1-8.
77. Frisella WA, O'Connor LH, Vogler CA, Roberts M, Walkley S, Levy B, Daly TM, Sands MS. *Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII*. Mol Ther 2001; 3: 351-7.
78. Elliger SS, Elliger CA, Lang C, Watson GL. *Enhanced secretion and uptake of  $\beta$ -glucuronidase improves adeno-associated viral-mediated gene therapy of mucopolysaccharidosis type VII mice*. Mol. Ther. 2002; 5: 617-26.
79. Hartung SD, Reddy RG, Whitley CB, McIvor RS. *Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblast by adeno-associated virus-mediated transduction of the  $\alpha$ -L-iduronidase gene*. Hum Gene Ther 1999; 10: 2163-72.
80. Fu H, Salmuski R.J, McCown TJ, Picornell YJ, Fletcher D, Muenzer J. *Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus mediated gene delivery*. Mol Ther 2002; 5: 42-9.
81. Marwick C. *FDA halts gene therapy trials after leukaemia case in France*. BMJ 2003; 326: 181.
82. Gutiérrez MA, Cerón F, García F, Barrera LA. *Construcción y evaluación de un vector de expresión episomal conteniendo el cDNA de la IDS para corregir la deficiencia enzimática en fibroblastos de paciente con síndrome de Hunter*. III Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Octubre 21-24 de 2001, Cartagena, Colombia.
83. Barrera LA. *Desarrollo de un modelo de vectores usando virus adenoasociados libre de adenovirus para corregir la deficiencia enzimática en las mucopolisacaridosis*. IV Congreso de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Octubre 24-27 de 2003, Iguazú, Argentina.