

Presentamos una nueva entrega sobre artículos relacionados con trastornos del ciclo de la urea, con la traducción de una revisión sobre novedades terapéuticas.

Se realiza una revisión sobre nuevas estrategias y enfoques terapéuticos en los TCU. Trata sobre aquellos nuevos tratamientos que ya se encuentran bajo ensayos clínicos en humanos y otros en fase más preclínicas.

Adquiere una importancia mayor en este artículo aquellas opciones terapéuticas relacionadas con la terapia génica que tanto se está desarrollando en los últimos años.

“Progress and challenges in development of new therapies for urea cycle disorders”

Leandro R. Soria, Nicholas Ah Mew, and Nicola Brunetti-Pierr

Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli 80078, Italy, Rare Disease Institute, Children’s National Health System, Washington, DC 20010, USA, Department of Translational Medicine, Federico II University of Naples, Naples 80131, Italy

Human Molecular Genetics, Volume 28, Issue R1, October 2019, Pages R42–R48.

Revisado por Silvia Chumillas Calzada

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos del ciclo de la urea (TCU) son errores innatos del metabolismo hepático causado por deficiencia de enzimas requeridas para transferir nitrógeno del amonio a la urea. Tienen alta mortalidad tanto en las formas neonatales como en las de inicio tardío. Piedras angulares del tratamiento de los TCU son: dieta hipoproteica y fármacos que activan vías alternativas para disminuir el amonio.

La arginina se convierte en un aminoácido esencial en TCU, y por lo tanto, suplementación con arginina, o con su precursora la citrulina. La deficiencia de N-acetilglutamato sintetasa (NAGS) es el único TCU en el que la ureagénesis puede ser mejorada por N-carbamilglutamato.

La diálisis es uno métodos más rápidos para reducir las elevaciones agudas de amonio en plasma. La hemodiálisis es más eficiente que la diálisis peritoneal en el aclaramiento de amoníaco, y actualmente se recomienda como tratamiento de elección. En comparación con la hemodiálisis, la diálisis peritoneal es menos utilizada, aunque ofrece flexibilidad y autonomía. Se utiliza en el tratamiento de hiperamonemia aguda de emergencia cuando la hemodiálisis no está disponible. Dadas estas consideraciones, se ha desarrollado un nuevo tipo de diálisis: diálisis peritoneal apoyada por liposomas para atrapar y eliminar amonio plasmático. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar la seguridad y eficacia de este enfoque.

Nuevos modelos terapéuticos se están investigando actualmente tanto a nivel clínico como preclínico.

2. TRASPLANTE HEPÁTICO Y DE HEPATOCITOS

El trasplante ortotópico de hígado es actualmente el único método para la reparación a largo plazo de la actividad hepática del ciclo de la urea. Los niveles de amonio se normalizan en los receptores de trasplante de hígado, pero el defecto bioquímico no se corrige en otros tejidos. Por lo tanto, en el déficit de argininosuccinato liasa (ASL) en el cual el defecto enzimático se expresa más ampliamente, el fenotipo sistémico persiste después de trasplante. Una reciente revisión retrospectiva que incluye 278 pacientes pediátricos y adultos con TCU que habían recibido un trasplante ortotópico de hígado mostraron que la supervivencia del paciente a 5 años fue del 89%, mientras que la supervivencia del aloinjerto varió de 77% a 92%, dependiendo

de la edad al trasplante. Además, existen datos que sugieren que el trasplante hepático puede estabilizar o mejorar los resultados neurocognitivos, particularmente cuando es realizado en etapas tempranas de la vida. Se esperan más datos sobre un estudio que investiga diferencias en mortalidad, resultados neurocognitivos y calidad de vida entre pacientes con TCU con tratamiento médico o que reciben trasplante hepático (NCT no. 02740153).

El trasplante de células hepáticas heterólogas humanas ha sido propuesto como alternativa o terapia "puente" hasta el trasplante ortotópico hepático, especialmente en lactantes con mayores riesgos y complicaciones quirúrgicas. Las células hepáticas pueden obtenerse y criopreservarse a partir de órganos de donantes humanos, incluidos aquellos que no son adecuados para trasplante de órgano completo. De este modo, múltiples receptores pueden beneficiarse de un solo donante. Las células se infunden a través de la vena porta y se injertan en el hígado nativo. Estas células trasplantadas deben tener una ventaja de crecimiento sobre las células receptoras para que el injerto funcione. Otra opción es extraer hepatocitos endógenos para permitir la proliferación y expansión de las células trasplantadas y, así, lograr la repoblación hepática con hepatocitos corregidos. Las células trasplantadas en TCU tiene una capacidad limitada para proliferar y no tiene una ventaja de crecimiento sobre las células enfermas. Por este motivo, con frecuencia el efecto se pierde con el tiempo debido al rechazo inmune o la senescencia celular. Esta técnica solo ha demostrado un aumento modesto en la ureagénesis que no parece ser clínicamente relevante. Puede atenuar pero no prevenir las crisis de hiperamonemia. Además de la terapia inmunosupresora, requiere mantenimiento a largo plazo con la terapia con quelantes del amonio y la restricción de proteínas en la dieta, aunque algunos pacientes toleraron de manera adecuada la liberalización de la dieta.

En comparación con los hepatocitos maduros, el trasplante de células madre mesenquimales que pueden diferenciarse en hepatocitos "in vivo" ofrece varias ventajas potenciales, incluida una mayor capacidad de repoblación después del injerto y mayor tolerancia inmune. Además, las células madre pueden ser producidas en cultivos a gran escala, y no dependen de la disponibilidad del órgano donante. Un ensayo clínico de fase 1/2 ha demostrado restauración parcial de ureagenesis en los receptores que parecían alcanzar su punto máximo a los 6 meses tras la infusión.

Un número creciente de estudios preclínicos han demostrado que los hepatocitos autólogos derivados de células madre pluripotente son efectivos en la reparación de hígados dañados. Los hepatocitos específicos del paciente derivados esta técnica puede corregirse por herramientas de edición del genoma e infundir en el paciente mediante el mismo procedimiento utilizado para el trasplante de hepatocitos. Sin embargo, este enfoque resultó en una leve mejora de supervivencia de ratones con argininemia.

3. FÁRMACOS BASADOS EN ÓXIDO NÍTRICO Y OTROS

En déficit de ASL se encuentra asociado con la deficiencia de óxido nítrico (NO) resultando en manifestaciones sistémicas. Podría tener efectos en rescatar la pérdida de peso, aumentar la supervivencia y reducir las cifras de tensión arterial (estudios en ratones). Existen ensayos clínicos en curso que evalúan la suplementación con óxido nítrico en pacientes con deficiencia de ASL (NCT nos. 02252770 y 03064048). Sin embargo, la síntesis de NO no parece afectada en defectos proximales del ciclo de la urea, incluyendo el déficit de ornitín transcarbamilasa (OTC) (24). Por lo tanto, en este momento NO se pueden considerar tratamiento solo para el déficit

de ASL y posiblemente argininosuccinato sintetasa. Este tratamiento no mejora las crisis de hiperamonemia, solo las características de la enfermedad debido a la depleción de NO, como aumento de la presión arterial y posiblemente otros (por ejemplo, síntomas neuropsiquiátricos).

El conocimiento reciente de las interacciones del ciclo de la urea con el metabolismo de los ácidos biliares y la autofagia ha ampliado el espectro de posibles intervenciones para mejorar la hiperamonemia en TCU. El receptor X farnesoide (RXF) es un regulador del metabolismo dependiente de los ácidos biliares cuya activación estimula el catabolismo de aminoácidos y la eliminación de amonio a través de la ureagenesis y la síntesis de glutamina. Se ha encontrado también que el ácido obeticólico (agonista de RXF, usado en colangitis biliar primaria) induce enzimas del ciclo de la urea, como ASS1, ASL y ARG1 y puede reducir las cifras de amonio.

La mejora de autofagia hepática promueve el aclaramiento de amonio mediante aumento de la ureagenesis como consecuencia del reciclaje de metabolitos intermedios y energía. Existen estudios que sugieren que la autofagia podría ser una diana terapéutica en TCU.

4. TERAPIA DE REEMPLAZO DE PROTEÍNAS Y ARNm

La terapia enzimática sustitutiva se ha usado en las enfermedades lisosomales basándose en que estas enzimas son absorbidas naturalmente por las células a través del receptor de manosa-6-fosfato. Por otro lado, las enzimas citosólicas o mitocondriales generalmente no son absorbidas por las células y, por lo tanto, esta terapia supone un desafío mayor en los TCU. La argininemia podría ser una enfermedad candidata para terapia enzimática sustitutiva. La hiperamonemia es poco frecuente en la argininemia, y la mayoría de las manifestaciones neurológicas son secundarias a un aumento niveles sanguíneos de arginina. Recombinante humano pegilado infundido. ARG1 (recombinante humano pegilado) ha sido efectivo para reducir la arginina plasmática en modelos murinos de argininemia. Aunque la supervivencia del ratón no mejoró probablemente porque la enzima pegilada no se introdujo en los hepatocitos y no mejoró la hiperamonemia que explica la letalidad. El potencial terapéutico de ARG1 recombinante en pacientes con argininemia se encuentra actualmente en evaluación en un ensayo clínico en fase 2 (NCT no. 03378531).

A diferencia de la terapia enzimática, la terapia con ARNm a la se encuentra más fácilmente disponible para TCU y ha demostrado ser una estrategia prometedora en errores congénitos del metabolismo hepático.

Esta terapia se basa en la administración sistémica de nanopartículas lipídicas que contienen ARNm sintético diseñado para ser inmunológicamente inactivo y estable. Las moléculas de ARNm son inyectadas por vía intravenosa y son absorbidas en gran parte por el hígado. Una vez han entrado en los hepatocitos, utilizan la maquinaria celular para producir la proteína terapéutica, superando los obstáculos que se producen en la terapia enzimática. Además, en contraste con la terapia génica mediada por vectores virales, la terapia de ARNm no tiene riesgos de mutagénesis insercional. Un inconveniente de este enfoque puede ser la necesidad de múltiples infusiones de ARNm debido a corto plazo debido a la escasa duración del ARNm liberado dentro de las células. Las repetidas administraciones de OTC mRNA humano ha normalizado los niveles de amonio y mejorado la supervivencia en ratones deficientes en OTC. La seguridad y tolerabilidad de este agente terapéutico está bajo investigación clínica en pacientes con deficiencia de OTC (NCT no. 03767270). Un enfoque similar con ARG1 también está siendo investigado en líneas celulares pero aún no en el modelo de ratón.

Se ha investigado con vesículas extracelulares para restaurar ambas actividades y producción de urea a través de la transferencia de la enzima ASS1 y ARNm en células deficientes en ASS1. Estas vesículas están implicadas en el intercambio intercelular de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estas vesículas extracelulares podrían usarse como transporte para una entrega combinada de proteínas y ARNm. Sin embargo, existen varios problemas relacionados con la producción y caracterización de tales vesículas para su uso clínico y el riesgo de rechazo inmune. Esto debe ser evaluado "in vivo" para establecer la relevancia clínica de este enfoque.

5. TERAPIA DE REEMPLAZO GENÉTICO. TERAPIA GÉNICA

Los TCU se han considerado durante mucho tiempo buenos objetivos para la terapia génica debido a su gravedad y la necesidad de administrar el gen terapéutico solo al hígado para lograr la normalización del amonio. Se han investigado múltiples sistemas de vectores, pero en general, los vectores virales adenoasociados (AAV) han surgido como los más atractivos para la terapia génica dirigida al hígado en función de su seguridad y eficacia. Se ha informado de corrección del ciclo de la urea a mediante terapia génica con AAV en modelos de ratón de con déficit de OTC, ASS1, ASL y ARG1. Sin embargo, su traducción a la clínica ha supuesto un desafío importante debido a:

- requiere un alto porcentaje de hepatocitos transferencia de genes para lograr la corrección del fenotipo;
- el logro de niveles adecuados de expresión transgénica con suficiente rapidez en el contexto de una enfermedad neonatal severa;
- la pérdida de genomas no integrantes como consecuencia del hígado crecimiento. La corrección a largo plazo de la actividad del ciclo de la urea podría, por lo tanto, requerir una readministración de vectores, que a su vez se ve obstaculizada por inducción de respuestas inmunes contra el vector reinfundido

Además, la administración precoz de la infusión y la alta dosis inicial parecen ser los factores críticos para la genotoxicidad y los riesgos de carcinoma hepatocelular después del suministro del gen AAV, al menos en roedores. Por otra parte, varios estudios a largo plazo estudios que incluyen modelos animales más grandes como perros y los primates no humanos (41,42) no han demostrado genotoxicidad hepática hasta el momento. Sin embargo, el número de sujetos tratados con AAV siguen siendo pequeño, aunque mantienen un cuidadoso seguimiento y vigilancia.

Los estudios preclínicos en ratones deficientes en OTC, han derivado en ensayos clínico que encuentran en fase 1/2 actualmente, con el serotipo 8 AAV (AAV8) para OTC en adultos de inicio tardío (NCT no. 02991144). Para otros TCU, se han realizado estudios preclínicos, pero aún no han resultado en ensayos clínicos. Una sola inyección de un AAV8 que expresa ASS1 dio como resultado una reducción del amonio plasmático, concentraciones de citrulina y mejora fenotípica significativa de supervivencia, crecimiento y piel. Entre los TCU, la citrulinemia sería una enfermedad adecuada para este enfoque porque los niveles de citrulina en sangre son biomarcador de enfermedad fácilmente disponible.

En comparación con otros TCU, los pacientes con déficit de ASL tienen una enfermedad sistémica, que implica afectación de cerebro, hígado, riñón, intestino y arterias periférica. Estos pacientes presentan una alta tasa de deterioro neurocognitivo, epilepsia y ataxia a pesar de una tasa más baja de episodios de hiperamonemia. Estas características hacen que sea un objetivo

difícil para terapia génica y, de hecho, la infusión de un gen dirigido al hígado en esta enfermedad resultó en la corrección del defecto de ureagenesis pero no los defectos fenotípicos restantes, particularmente el trastorno cerebral.

Se ha administrado en ratones con argininemia inyecciones intravenosas en periodo neonatal de AAVrh10 que libera ARG1 a las células hepáticas. Fueron efectivas con mejora bioquímica y de las alteraciones neurológicas que presentaban los roedores. Estos resultados son concordantes con la hipótesis de que la afectación cerebral ocurre como consecuencia de la hiperargininemia.

El déficit de CPS1 es, especialmente, un reto para la terapia génica debido a su gravedad, apareciendo en periodo neonatal y pudiendo causar la muerte de manera muy temprana y gran tamaño del gen que codifica CPS1 que no se puede empaquetar dentro de vectores AAV. Los vectores AAV pueden acomodar secuencias de hasta 4.5–5 kb de tamaño, mientras que la inclusión de secuencias mayores que 5 kb reduce significativamente la potencia “in vivo”. Se han buscado estrategias para superar este inconveniente como: utilizar una versión más pequeña del gen que codifica una enzima CPS1 funcionalmente activa (todavía no se ha desarrollado) o usar un vector dual en el que un gran transgén se divide en mitades que se empaquetan por separado y se proporcionan como una doble mezcla de vectores AAV.

6. EDICIÓN GENÉTICA

La edición del genoma consiste en la corrección de secuencias mutantes en el ADN. Se logra mediante proteínas quiméricas compuestas de un dominio de unión con una secuencia de ADN específica y una endonucleasa que induce la ruptura de la doble cadena de ADN en un sitio específico. Las herramientas de edición del genoma incluyen nucleasas con dedos de zinc, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción, y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)/CRISPR asociado a proteína 9 (Cas9). La edición del genoma “in vivo” se basa en la entrega a células objetivo de múltiples vectores o nanopartículas lipídicas que llevan componentes de la maquinaria de edición. Sin embargo, la maquinaria de edición puede provocar daños en el ADN que en última instancia podría predisponer al cáncer.

Además, la escisión fuera del objetivo es una limitación de las herramientas de edición del genoma. Mejoras en el diseño de guías y la nueva generación de CRISPR / Cas9 con mayor especificidad son críticas para mejorar los niveles de escisión dentro del objetivo.

En ratones deficientes en OTC, una estrategia de edición del genoma implica la inyección en ratones recién nacidos de dos vectores AAV, uno que expresa Cas9 y el otro una guía de ARN y el ADN del donante, resultaron en corrección de la alteración en aproximadamente el 10% de los hepatocitos. Sin embargo, en ratones adultos con deficiencia de OTC, el porcentaje de corrección genética fue menor y se asoció con un empeoramiento del fenotipo y deleciones más grandes que afectaron también al gen OTC. Estos estudios ilustran que este enfoque aún no está listo para su aplicación en la clínica.

7. BACTERIAS SINTETICAMENTE MODIFICADAS PARA LA DETOXIFICACIÓN DE AMONIO

El campo de la biología sintética y la ingeniería de microbioma puede suponer una gran promesa para el tratamiento de varias enfermedades humanas a través del desarrollo de microbios inteligentes que pueden detectar o tratar enfermedades. El amonio es producido por el metabolismo bacteriano en el intestino. Los antibióticos se usan para inhibir el crecimiento de bacterias productoras de ureasa en el intestino, lo que disminuye la producción de amonio y su absorción a través del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, la rifaximina, un antibiótico de absorción mínima ha demostrado su eficacia en hiperamonemia, pero su uso a largo plazo plantea preocupaciones para el desarrollo de resistencia antimicrobiana. La inoculación de microbiota intestinal predefinida con mínima expresión de ureasa en lugar de la microbiota preexistente resultó ser efectiva para reducir el amonio fecal y mejorar las alteraciones neurológicas y del comportamiento y la mortalidad en insuficiencia hepática en modelo de ratón. Sin embargo, la eficacia de este enfoque no ha sido investigado en TCU. La administración de una cepa de "Lactobacillus plantarum" genéticamente modificada para el hiperconsumo de amonio reduce los niveles de amonio y la mortalidad en roedores con hiperamonemia, incluyendo deficiencia de OTC. Además, una Escherichia coli probiótica diseñado para convertir el amonio en arginina fue eficaz para reducir los niveles de amonio sistémico y mejorar de la supervivencia en modelos de ratón con hiperamonemia, incluyendo ratones deficientes en OTC. Un estudio de fase 1 en voluntarios sanos adultos mostró que esta bacteria fue bien tolerada y mostró actividad "in vivo" y actualmente se está evaluando en pacientes con cirrosis (NCT no. 03447730) y podría considerarse en los TCU.

8. CONCLUSIONES

A pesar de las terapias actuales, la morbilidad sigue siendo alta en los TCU, y por lo tanto, se han investigado varios enfoques para mejorar los resultados clínicos. Existen nuevas ideas sobre la participación de ASL en la producción sistémica de NO, y autofagia y FXR en ureagenesis y síntesis de glutamina. Este nuevo conocimiento tiene potencial para el desarrollo de nuevas terapias. Las terapias celulares generalmente han demostrado una eficacia limitada y requieren un mayor desarrollo para superar estas limitaciones.

Aunque la terapia génica ha sufrido reveses clínicos, el desarrollo de nuevos vectores y los resultados de ensayos clínicos sobre terapia génica en hemofilias; ha despertado entusiasmo para el desarrollo de la terapia génica en TCU, particularmente OTC.

Terapia génica para otros TCU como CPS1 y déficit ASL son más desafiantes debido al gran tamaño del gen o necesidad de transferencia de genes a múltiples tejidos además del hígado para lograr la corrección fenotípica. La traducción clínica de la terapia génica se ve obstaculizada por el alto porcentaje del hepatocito requerido para la corrección, pérdida de corrección debido a crecimiento hepático, genotoxicidad y respuestas inmunes contra los vectores virales. Sin embargo, pueden desarrollarse estrategias para superar estas limitaciones como la optimización de la transferencia de genes y herramientas de edición del genoma. Mientras tanto, la administración de dosis repetidas de ARNm puede estar más fácilmente disponible y puede utilizarse como puente para la terapia de reemplazo génico una vez que ha finalizado el crecimiento hepático.