

Terapia génica de los tumores hepáticos

La aplicación de la tecnología del ADN recombinante a la investigación médica ha supuesto un cambio sustancial en el entendimiento de la genética y la fisiopatología humana, y ha abierto así un nuevo frente en la lucha contra las enfermedades. Lo que hoy entendemos por terapia génica no es más que una aplicación de esa tecnología. Se puede definir a la terapia génica como la introducción de material genético en las células del huésped con el propósito de que su expresión permita eliminar o al menos mejorar un proceso patológico¹. Si bien la terapia génica surgió como una herramienta dirigida principalmente al tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias, una gran parte de los ensayos clínicos de terapia génica tiene por objeto el tratamiento de enfermedades adquiridas, especialmente el cáncer.

El punto crítico en el desarrollo de la terapia génica se encuentra en la disponibilidad de sistemas de transferencia del material genético, es decir, de vectores eficaces². En la actualidad existe una gran variedad de vectores, pero ninguno ha alcanzado la suficiente versatilidad como para adaptarse a las ilimitadas situaciones clínicas. Existen dos tipos generales de vectores, los virales y los físicos o no virales. La acción de los vectores virales está basada en los mecanismos de ingreso celular propios de los virus salvajes, lo que los convierte en muchas ocasiones en un mecanismo de transferencia génica de alta eficacia. Los vectores virales están diseñados sobre la base de virus, de los que se eliminan regiones implicadas en la replicación viral, aprovechándose de los mecanismos que ellos han desarrollado en su evolución para introducir material genético a las células que infectan. En la mayor parte de los casos el vector viral es defectivo, ya que puede infectar a las células aunque haya perdido su capacidad de replicar. Los vectores virales son los que se emplean en la gran mayoría de las estrategias utilizadas en la terapia génica experimental y clínica. Así, encontramos vectores basados en adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus vaccinia, lentivirus, α -virus. Por otro lado están los vectores no virales obtenidos por síntesis entre los que destacan La pistola génica, liposomas, complejos constituidos por ácidos nucleicos y ligandos específicos. La mayoría de estos vectores son poco eficaces y tienen importantes dificultades en permitir una expresión sostenida del transgén.

En la actualidad no es posible desarrollar un vector universal aplicable a cualquier tipo de enfermedad, por lo que se justifica el desarrollo de una amplia diversidad de vectores teniendo en cuenta que cada patología es pasible de ser tratada con un vector que se le adapte. Las expectativas que ha generado el Proyecto Genoma Humano obligan a un intenso desarrollo de los vectores que permitan la utilización de los genes como nuevos agentes farmacológicos.

El desarrollo de respuesta inmunitaria frente a los antígenos virales, y especialmente frente a los adenovirus de primera generación, si bien limita la duración de la expresión del transgén, puede incrementar el beneficio terapéutico de las estrategias de inmunoterapia génica. Esta breve expresión del gen terapéutico puede ser suficiente para el tratamiento del cáncer cuando, tras la destrucción de las células tumorales con genes suicidas o después del desarrollo de respuesta inmunitaria por la acción de genes de citoquinas, no se requiera una expresión duradera de estos genes. Cuando se requiere

una expresión sostenida del transgén se prefiere utilizar vectores que puedan integrarse en un sitio específico del cromosoma del huésped (como es el caso de los VAA) o que permanezcan de manera episomal estable (adenovirus "gutless").

El hígado tiene una serie de características que lo convierten en un excelente candidato para la terapia génica, la cual parece aplicable en numerosas situaciones clínicas, como los errores congénitos del metabolismo, las hepatitis virales, la cirrosis y las neoplasias primarias o metastásicas³.

El hepatocarcinoma es una de las neoplasias sólidas de mayor incidencia mundial y el más frecuente de los tumores primitivos del hígado⁴. Aunque existen grandes diferencias geográficas en la incidencia global y en la frecuencia en que coexiste con cirrosis hepática, el pronóstico del hepatocarcinoma es universalmente ominoso. Se estima que 1 250 000 personas mueren anualmente a consecuencia de esta enfermedad. La resección quirúrgica es el tratamiento de elección, aunque no siempre resulta posible, por lo que sólo beneficia a un mínimo número de pacientes. También el trasplante hepático puede resultar curativo, pero está limitado a pacientes que presentan lesiones pequeñas sin metástasis extra-hepáticas. Las terapias loco-regionales –como la inyección percutánea de etanol, quimioembolización transarterial o radiofrecuencia– no mejoran significativamente la supervivencia, y su utilidad se limita a fines paliativos. Tampoco la radioterapia mejora la supervivencia en el hepatocarcinoma avanzado, y no se conoce ningún tratamiento quimioterápico eficaz en esta etapa. Como consecuencia, existe un creciente interés en desarrollar nuevas opciones terapéuticas y es en este contexto donde la terapia génica parece ser una alternativa promisoría.

Una modalidad de terapia génica antineoplásica es la eliminación de células tumorales mediante sistemas de sensibilización a fármacos que generan localmente metabolitos tóxicos a través de reacciones enzimáticas. Este abordaje terapéutico utiliza genes que codifican enzimas de origen viral o bacteriano que producen metabolitos tóxicos para las células que los alberga a partir de profármacos o fármacos inactivos. Entre los genes denominados suicidas el mejor caracterizado es el gen de la timidina quinasa perteneciente al virus *Herpes Simplex* (HSV-*tk*) que transforma el ganciclovir (GCV) en un compuesto trifosforilado que actúa como un terminador de cadena sobre la síntesis del ADN paralizando la replicación y provocando la muerte celular. Uno de los mecanismos en los que se basa este sistema es la producción del efecto «espectador» o «*bystander*», que ejercen las células transducidas sobre las no transducidas. Gracias a este fenómeno se han observado remisiones tumorales completas en modelos tumorales experimentales, a pesar de obtener una transducción de solo el 10% de las células del tumor. El efecto espectador podría explicarse, al menos en parte, por la transferencia de análogos del nucleósido entre células HSV-*tk* positivas y HSV-*tk* negativas a través de las uniones intercelulares, o mediante la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por las células vecinas. Se ha observado que el efecto «*bystander*» no se produce exclusivamente en el tumor tratado, sino que existe un efecto a distancia sobre las lesiones secundarias llevado a cabo por una respuesta inmunitaria celular. Para la aplicación de este sistema terapéutico se han utilizado vectores adenovirales y retrovirales portadores del gen HSV-*tk* con objeto de sensibilizar a diversas líneas celulares de hepatocarcinoma a los efectos del GCV, lográndose como consecuencia remisiones tumorales importantes en diversos modelos experimentales⁵. Sin embargo, se ha observado que la transferencia del sistema HSV-*tk*/GCV a los hepatocitos normales se asocia al desarrollo de diversos grados de toxicidad hepática. Para evitar estos efectos se han diseñado vectores controlados por promotores específicos de tumor como la α -fetoproteína (α FP) que impiden que el vector aplicado directamente sobre la lesión tumoral o por vía sistémica actúe sobre los hepatocitos normales que no producen α FP.

En la terapia génica de los tumores hepáticos es importante considerar el uso de promotores específicos de tumor que permitan una expresión selectiva del transgén en las células tumorales, para minimizar el riesgo de toxicidad asociado con la diseminación del vector hacia el tejido hepático sano o a otros tejidos⁶. Tras el nacimiento, los sujetos normales tienen casi totalmente reprimida su capacidad de producir α -FP, pero ésta reaparece y se sobreexpresa en cerca del 50% de los hepatocarcinomas en los que sirve como marcador tumoral. La α -FP ha sido utilizada como promotor específico de vector para controlar la expresión de genes clonados en diversos vectores virales, permitiendo que el gen terapéutico se exprese exclusivamente en las células con capacidad para producir α -FP.

Hoy sabemos que el cáncer se desarrolla como consecuencia de una combinación de alteraciones entre oncogenes y oncosupresores. Dirigir la terapia génica hacia la neutralización de oncogenes implicados en el desarrollo de los hepatocarcinomas es una interesante opción terapéutica. Esto se puede lograr a través de la inserción de secuencias antisentido dirigidas directamente a oncogenes como el *N-ras*, que aparece hiperexpresado en cerca del 50% de los hepatocarcinomas. De manera similar se ha intentado inhibir el crecimiento de tumores utilizando secuencias antisentido frente a factores de crecimiento vascular como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), o el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), cuya inhibición puede prevenir la aparición de metástasis. Aunque muchos de estos tratamientos han sido efectivos en el ámbito experimental, las terapias antisentido requieren de vectores altamente efectivos en la transducción de las células tumorales lo que limita en gran medida las posibilidades de aplicación clínica.

Se pueden revertir las propiedades neoplásicas de numerosos tumores insertando copias normales de genes supresores de tumores como *p53* o *rb*. En los pacientes con hepatocarcinoma es frecuente encontrar mutaciones en el gen *p53*, especialmente en aquellas zonas donde existe elevada prevalencia de infección por el virus de la hepatitis B. En este sentido se han diseñado estrategias dirigidas a introducir copias normales del gen *p53* en las células tumorales con el fin de restaurar la normalidad tisular. La aplicación de este tratamiento ha demostrado tener una importante actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis sobre diversas líneas celulares tumorales de hepatocarcinoma empleando diversos vectores. Lamentablemente para inhibir completamente el crecimiento de los tumores se requiere una eficiencia de transducción cercana al 100% que no es posible alcanzar con los vectores disponibles en la actualidad.

El consenso actual es que aunque hay potencial antigénico en las células tumorales este no es suficiente como para estimular el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada, y existe evidencia científica como para afirmar que la relación entre el sistema inmunitario y los antígenos potenciales del tumor es de mutua indiferencia, esto es lo que llamamos «ignorancia inmunológica». Esta falta de reacción del sistema inmunitario podría explicarse por alguna de las siguientes razones⁷: - Procesamiento y presentación ineficaz de antígenos tumorales; - Falta de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, - Producción tumoral de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) que impiden la activación de células T llevándolas a un estado de «anergia»; - Inducción de apoptosis de las células T antitumorales activadas mediante la expresión del ligando de Fas en las células neoplásicas, creando así una zona de «inmunoprivilegio» en el área tumoral.

En este contexto, el uso de citoquinas inmunomoduladoras supone una alternativa importante, dado el papel estratégico que desempeñan en la regulación del sistema inmunitario. Algunas técnicas de transferencia génica procuran modificar las células tumorales para que produzcan citoquinas inmunoestimuladoras. Esta producción local podría alterar la tolerancia del sistema inmunitario hacia las células tumorales, permitiendo la eliminación del tumor. Esto se puede realizar transduciendo *ex vivo* o *in vivo* tanto células tumorales como fibroblastos, con vectores que vehiculizan genes de citoquinas. Son muchas las citoquinas utilizadas para estimular el rechazo tumoral, entre ellas están la IL-2, IL-4,

IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, INF- γ , TNF- α , GM-CSF. Muchas de estas citoquinas han sido empleadas en diversos modelos murinos para terapia génica del hepatocarcinoma con resultados alentadores tanto en experimentos realizados *in vivo* como *in vitro*.

Las células presentadoras de antígeno (CPA) desempeñan un importante papel en la generación y regulación de la respuesta inmunitaria antitumoral. Las células dendríticas representan un tipo celular altamente especializado en presentar antígenos de modo productivo a los linfocitos T. Teniendo en cuenta estas propiedades pueden ser manipuladas artificialmente para la presentación de antígenos tumorales ya sea pulsándolas con péptidos o extractos tumorales, o mediante la transferencia de genes que codifican antígenos tumorales relevantes. La administración de estas células manipuladas *ex vivo* es capaz de generar una intensa respuesta inmunitaria antitumoral, experiencia que también se está desarrollando en algunos modelos animales de hepatocarcinoma.

Entre los diversos vectores virales empleados, los retrovirus han sido de los vectores más explotados. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino en el que se inhibe la tumorigenicidad tras la inyección de células de hepatocarcinoma (BNL) infectadas con un vector retroviral que expresa los genes de IL-12⁸. Esta modalidad terapéutica condujo al desarrollo de una respuesta inmunitaria específica mediada por células T que permitió el rechazo de los tumores.

La vascularización de los tumores mediante la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos es un proceso crítico para el crecimiento y diseminación de la neoplasia, condición que es universal en todas las estirpes tumorales. El endotelio vascular posee dos características muy importantes que realzan el papel que pueden desempeñar las terapias antiangiogénicas en el tratamiento del cáncer. Por un lado, la estabilidad genética de las células del endotelio vascular hace que sea poco probable el desarrollo de resistencia al tratamiento por mutaciones; y por otro lado, las terapias enfocadas a destruir las células del endotelio vascular permitirían, en teoría, eliminar cualquier tipo de tumor. Existen numerosas dianas terapéuticas potencialmente explotables por la terapia génica en la interfase tumor-estroma que posibilitarían la destrucción de la vasculatura tumoral. En modelos animales, la supresión de las señales pro-angiogénicas entre las que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, o la amplificación de la función de factores con propiedades anti-angiogénicas, como angiostatina, endostatina o quimiocina IP-10 se han revelado exitosas. El mayor problema que tiene esta estrategia, cuando se administra de manera aislada, es que debería aplicarse en fases precoces del desarrollo tumoral, por lo que no resulta muy efectiva en tumores ya consolidados.

El pronóstico de los pacientes con carcinoma de colon que presentan metástasis hepáticas es invariablymente pobre y no existe ninguna terapéutica eficaz que erradique los tumores. Una limitación mayor de las terapias antineoplásicas, es que buena parte de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad cuando ya existen metástasis, lo que conlleva al fracaso de las maniobras terapéuticas con posibilidades curativas.

Recientemente hemos aplicado una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento del cáncer de colon diseminado en un modelo experimental desarrollado en ratones, mediante la terapia combinada entre un vector adenoviral que expresa los genes de IL-12 y la terapia celular adoptiva con linfocitos específicos antitumorales. Este abordaje terapéutico permitió erradicar cerca del 90% de los tumores metastásicos e incrementar significativamente la supervivencia de los animales tratados de esta manera⁹. De un modo similar, en un modelo murino de cáncer de colon metastásico hemos obtenido un alto índice de remisiones tumorales completas empleando un adenovirus que expresa IL-12 administrado junto con otro adenovirus que expresa la quimiocina IP10¹⁰.

De todos los enfoques terapéuticos experimentales que han sido comentados, solo algunos de ellos están siendo investigados en la clínica. Recientemente se ha completado un ensayo en fase I en el que

se ha empleado un adenovirus portador del gen supresor de tumores *p53* mediante infusión arterial hepática para el tratamiento del hepatocarcinoma. Si bien en estos protocolos no se han obtenido respuestas objetivas se concluye que el virus fue bien tolerado. En otro ensayo en fase I para el tratamiento del hepatocarcinoma con un plásmido que expresa el gen *p53* y aplicado por vía intratumoral fue posible obtener reducción de los niveles de α -FP previos al tratamiento e incluso una remisión tumoral completa. La administración, en el marco de un ensayo en fase I, de un vector liposomal que contiene la molécula HLA-B7 a pacientes con metástasis hepáticas de cáncer de colon ha permitido el desarrollo de respuesta inmunitaria consistente en células LAK, NK y linfocitos T citotóxicos anti-HLA-B7, pero a pesar de ello no se ha evidenciado ninguna respuesta objetiva. Es evidente que estamos en los albores del traslado a la clínica de toda la experiencia obtenida en la fase experimental.

Como colofón, en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten introducir genes en el interior celular y hacer que se expresen en las células de manera estable o transitoria. Esto ha permitido modular muy eficientemente la biología de los procesos tumorales e incluso llegar a inducir remisiones del proceso neoplásico impensables con las pautas terapéuticas empleadas hasta el presente. La terapia génica está abriendo perspectivas esperanzadoras en el tratamiento de los tumores hepáticos cuando la enfermedad ha sobrepasado los límites que permiten el abordaje quirúrgico radical. Ampliar nuestros conocimientos acerca de la biología de los tumores, incrementar la eficacia en la transducción que permita el empleo de genes con elevado potencial antitumoral, disminuir los efectos tóxicos asociados al tratamiento y la utilización de promotores específicos de tumor, son algunos de los desafíos que aún debemos superar.

Guillermo Mazzolini, Jesús Prieto

Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria
de Navarra, Irunlarrea 1. 31080. Pamplona. España
e-mail: gmazzolini@unav.es

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926-32.
- Verma I, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239-42.
- Ferry N, and Heard M. Liver-Directed Gene Transfer Vectors. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1 975-81.
- Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992;15: 948-63
- Qian C, Iodate M, Bilbao R, *et al.* Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 349-58.
- Qian C, Drozdziak M, Caselmann WH, Prieto J. The potential of gene therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 32: 344-51.
- Wick M, Dubey P, Koeppen H, *et al.* Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 1997;186: 229-38.
- Sun Y, Qian C, Peng D, Prieto J. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 plus interleukin 12 changes immunoeffector mechanisms and suppresses helper T cell type 1 cytokine production induced by interleukin 12 alone. *Hum Gene Ther* 2000 1; 11: 127-38.
- Mazzolini G, Qian C, Narvaiza I, *et al.* Adenoviral gene transfer of IL-12 into tumors synergizes with adoptive T-cell therapy both at the induction and the effector level. *Human Gene Ther* 2000; 11: 113-25.
- Narvaiza I, Mazzolini G, Qian C, Barajas M, Melero I, Prieto J. Intratumoral co-injection of two adenoviruses one encoding the chemokine IP-10 and another encoding interleukin 12 results in marked antitumoral synergy. *J Immunol* 2000; 164: 3112-122.