

## Evaluación in vivo de la transferencia génica

El desarrollo de protocolos clínicos de terapia génica -especialmente aquellos destinados al tratamiento del cáncer- es continuo y avanza a paso firme. Sin embargo, aunque más de 300 ensayos clínicos de terapia génica han sido puestos en marcha en el mundo, la información disponible sobre biodistribución, duración o eficiencia de la expresión de los diversos sistemas de transferencia génica es escasa o nula.

La capacidad de evaluar la transferencia de genes a los tejidos se limita actualmente al estudio de muestras obtenidas por biopsia o necropsia para estimar o cuantificar los niveles de proteínas, ADN o ARN, por lo que en la práctica resulta imposible saber en que órganos o tejidos se distribuye el vector una vez administrado<sup>1</sup>.

Los principales inconvenientes planteados en las primeras etapas de la terapia génica experimental consistían básicamente en la obtención de sistemas de transferencia génica capaces de transducir células o tejidos y de alcanzar aceptables niveles de expresión del transgén. Estos problemas se han ido superando con el avance en el desarrollo de los vectores. Sin embargo, con el inicio de los protocolos clínicos resurgen algunos problemas fundamentales como, por ejemplo, la imposibilidad de determinar *in vivo* si la transferencia génica ha sido efectiva; qué órganos o tejidos han sido transducidos; en dónde se expresa el transgén; cuánto dura y de qué magnitud es dicha expresión.

Estas incertidumbres pueden ser cruciales al momento de conocer o predecir el comportamiento del vector administrado. El desarrollo de un método no invasor aplicable a humanos que permitiera determinar *in vivo* de manera simple y repetida la localización y magnitud de la expresión génica significaría un avance de gran trascendencia. Su aplicación a la terapia supondría un inestimable aporte al perfeccionamiento de vectores, al uso de promotores específicos o la idoneidad de las vías de administración.

El concepto de la utilización de un gen reportero ( $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, proteína fluorescente verde) para la evaluación de la expresión de genes en diversos sistemas está ampliamente difundido desde hace tiempo, aunque la aplicación de esta técnica está limitada principalmente a los estudios *in vitro* y en modelos experimentales.

En la búsqueda de aproximaciones que permitan visualizar la expresión génica *in vivo* se han desarrollado en los últimos años sistemas que cuantifican la expresión de genes en mamíferos mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

La PET es una técnica no invasora de diagnóstico por imagen capaz de ofrecer información bioquímica y metabólica de los diferentes órganos. Básicamente, tras la administración de una pequeña cantidad de un compuesto con un marcador radiactivo, es posible la obtención de imágenes que permiten analizar la distribución del radiotrazador en el organismo. Los isótopos emisores de positrones de aplicación clínica son radioisótopos de elementos presentes en prácticamente la totalidad de las moléculas biológicas, entre ellos el <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O y <sup>18</sup>F que van unidos a una molécula de interés que sirve como trazador. Estos radiotrazadores de PET son ligandos de receptores o sustratos de enzimas y la retención en el tejido vivo ocurre como consecuencia de la unión al receptor o de la transformación

en un sustrato "atrapado". En los radiofármacos PET, la desintegración del isótopo conlleva a la emisión de energía detectada por complejos sistemas que permiten la reconstrucción volumétrica de la información, la generación de imágenes tomográficas de alta resolución y la obtención de datos de cuantificación absoluta.

Una de las múltiples estrategias diseñadas para la terapia génica del cáncer consiste en la aplicación de sistemas que permitan la activación local de profármacos con potencial tumoricida. Entre ellas se encuentra la transferencia a las células tumorales del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-tk). Esta enzima viral, al contrario que la humana, posee una alta afinidad por distintos análogos de nucleósidos, como el aciclovir, ganciclovir o el penciclovir. La producción por las células del tumor de la enzima viral permite en ellas la fosforilación selectiva del análogo, que interfiere entonces con la síntesis del ADN y produce la muerte celular. Esta aproximación terapéutica se ha mostrado efectiva en el tratamiento de modelos experimentales de muy diversos tumores y ha dado lugar a la puesta en marcha de ensayos clínicos que buscan esta actividad para el tratamiento de diferentes neoplasias<sup>2</sup>.

La visualización de la transferencia génica del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-tk) con PET se fundamenta en la utilización como sonda de imagen de la misma timidina kinasa que produce el efecto terapéutico<sup>3,4</sup>. De esta manera la administración sistémica de un análogo fluorado del ganciclovir (como el penciclovir fluorado) que es fosforilado de manera selectiva por la timidina kinasa conlleva a un atrapamiento celular del mismo de forma proporcional al gen, permitiendo la visualización externa y cuantificación del compuesto. De esta manera, en los sitios del organismo donde existe emisión de fotones es donde se encuentra también el gen de la timidina kinasa<sup>4</sup>. Con la administración de pequeñas cantidades del radiofármaco sería posible conocer la biodistribución del vector administrado, y de esta manera las señales *in vivo* captadas por la PET pueden relacionarse de manera cuantitativa con el nivel de expresión génica.

Existe ya evidencia clínica de la idoneidad de esta técnica en un ensayo clínico de terapia génica para pacientes con gliomas<sup>5</sup>. En el futuro resulta razonable postular la incorporación en los vectores de terapia génica de un gen reportero detectable mediante una técnica de imagen no invasora como la PET que nos permita analizar el comportamiento del vector utilizado y poder interpretar de una manera más aproximada los resultados de los tratamientos en cuanto a eficacia y toxicidad.

Guillermo Mazzolini, Bruno Sangro, Jesús Prieto

Unidad de Hepatología y Terapia Génica, Clínica Universitaria de Navarra,  
Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, España

e-mail: gmazzolini@unav.es

1. Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, *et al.* Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. *Nat Med* 2000; 6: 933-7.
2. Mazzolini G, Prieto J. Terapia génica de los tumores hepáticos. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 364-8.
3. Gambhir SS, Barrio JR, Wu L, *et al.* Imaging of

adenoviral-directed *Herpes simplex* virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir. *J Nucl Med* 1998; 39: 2003-11.

4. Gambhir SS, Barrio JR, Phelps ME, *et al.* Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2333-8.
5. Jacobs A, Voges J, Reszka R, *et al.* Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet* 2001; 358: 727-9.