

---

# Manipulación genética en oncología

---

J. Vicente

Servicio de Oncología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

## Introducción

Puesto que el cáncer tiene su origen en la alteración de algunos genes celulares, subsanar esta alteración debe ser el mejor tratamiento posible de la enfermedad. Además, la modificación genética de las células tumorales o la de las células del organismo que las alberga puede representar también una ayuda muy importante para otros tratamientos. Aunque hasta hace muy poco todo esto se consideraba una posibilidad quimérica, la terapéutica génica se está haciendo una realidad tangible en los últimos años, hasta el punto de que ya se han autorizado algunos ensayos clínicos en humanos<sup>1-3</sup>.

## Técnicas y procedimientos

La transferencia de genes entre células de mamífero por medio de técnicas directas *in vitro*, como la transfección por coprecipitación del DNA correspondiente con fosfato cálcico o su microinyección, fue inicialmente una excelente herramienta de trabajo para el estudio de los oncogenes<sup>4</sup>. Algunas de estas técnicas, como la encapsulación en liposomas, pueden también utilizarse *in vivo*, por inyección tisular. La utilización de vectores virales transformados por ingeniería genética, es decir, por técnicas de DNA recombinante, constituye, sin embargo, el método más específico y controlable para conseguir la transducción de un gen.

Para ello pueden emplearse DNA-virus (adenovirus, herpesvirus) y, sobre todo, retrovirus, anfotróficos, para que sirvan de «lanzaderas» y defectivos para la replicación, lo que asegura la primera infección y su integración en el genoma celular, pero sin el riesgo de sucesivas ondas de reinfección, aunque complica la técnica por la necesidad de utilizar sistemas celulares de multiplicación previa, con el riesgo de que se produzcan por recombinación virus cooperadores capaces de replicar, posibilidad que debe ser totalmente eliminada<sup>2</sup>. El segundo gran problema, es decir, la baja eficiencia de

la transducción a las células humanas<sup>5</sup>, puede obviarse o compensarse mejorando la expresión del gen, situándolo en el vector bajo la influencia de secuencias promotoras o intensificadoras de elevado funcionamiento en las células receptoras, lo que le confiere también, como se verá más adelante, mucha mayor selectividad o especificidad<sup>6</sup>. El problema de su corta permanencia<sup>7</sup> podría ser incluso beneficioso en algunos casos, aunque en otros puede ser un importante inconveniente que deberá subsanarse en el próximo futuro.

## Enfoques terapéuticos

Por el momento, existen cuatro campos básicos de aplicación de la terapéutica génica en oncología<sup>8</sup>. Dos de ellos intentan subsanar las alteraciones genéticas de la célula tumoral. Uno lo hace por reposición de genes oncosupresores particularmente perdidos. El otro, por inhibición de la expresión de oncogenes especialmente activados. Este último incluye también las tecnologías antisentido, por medio de oligonucleótidos cortos, que no se hacen habitualmente por técnicas de transferencia génica. Los otros dos campos de aplicación son la inmunomodulación genética y la optimización de la quimioterapia citotóxica, que comentaré brevemente a continuación.

## Inmunomodulación genética

Es esta la primera estrategia de la terapéutica génica que ha llegado al ensayo clínico en fase I, tanto en la vertiente de la inmunomodulación adoptiva como en la de la misma inmunomodulación activa, naturalmente específicas<sup>1,2</sup>.

## Inmunomodulación adoptiva específica

Los estudios más adelantados por el momento están utilizando la transferencia *in vitro* de genes de una citocina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), a los linfocitos de infiltración

tumoral (TIL) del paciente, para lograr su expresión y liberación *in vivo* en las proximidades de las células tumorales<sup>9</sup>, intentando mejorar los resultados prometedores de los TIL por sí mismos en algunos tumores altamente resistentes, como el melanoma, en el que habían logrado ya más de un 35% de remisiones<sup>10</sup>.

En la actualidad se planea también la inserción de otros genes de citocinas, especialmente interferón gamma, para estimular la expresión de antígenos de histocompatibilidad, y de receptor para Fc, con objeto de utilizarlos en conjunción con anticuerpos monoclonales, para añadir una respuesta citotóxica dependiente de anticuerpos<sup>9</sup>.

### **Inmunomodulación activa específica**

Se trata de un terreno especialmente interesante y prometedor en el que se están estudiando intensamente diversos tipos de vacunas antitumorales.

#### *Vacunas terapéuticas*

Es el enfoque más elaborado en la actualidad, cuyo principal escollo ha sido hasta el momento la baja inmunogenicidad de las células tumorales, debido a su escasa efectividad para el procesado y presentación de antígenos. En este sentido se están consiguiendo resultados alentadores utilizando células tumorales que expresan citocinas, conseguidas por la transferencia de sus genes con intensificadores adecuados. En experiencias animales se ha podido comprobar que la inoculación de una mezcla de células tumorales inmodificadas junto con las derivadas de las mismas capaces de expresar IL-2, IL-4, IL-7, TNF $\alpha$ , IFN-gamma o G-CSF, da lugar a la destrucción de ambas y en algunos casos suscita además una inmunidad duradera contra las primeras<sup>9,11</sup>. Esto puede conseguirse también con la transferencia de genes del complejo principal de histocompatibilidad clase I a las células tumorales que no los expresan, lo que se está ya intentando por una vía tan sencilla como la inyección intratumoral de plásmidos portadores encapsulados en liposomas<sup>2</sup>.

Todas estas estrategias requieren, naturalmente, la manipulación de cada tumor individual para el tratamiento del paciente que lo padece. Un sistema más genérico consiste en la utilización de genes de determinados antígenos importantes y comunes a una estirpe tumoral, como CEA, MCA o melanoferina (gp97) inser-

tados en un vector adecuado, como el virus vacunal (VV) o BCG recombinante, para obviar el defecto de su presentación que, de esta manera, se hace en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II<sup>12</sup>.

#### *Vacunas preventivas*

Este último enfoque puede ser ventajosamente utilizado para la prevención de los tumores humanos etiológicamente relacionados con virus oncogénicos. Tal es el caso del gen de la glucoproteína gp350, pero no de los antígenos nucleares, del virus de Epstein-Barr, que se asocia con el linfoma de Burkitt endémico y el carcinoma indiferenciado nasofaríngeo. Ya están próximos a iniciarse los ensayos clínicos en fase I utilizando algunas subunidades de este gen, vehiculadas en vectores virales basados en el VV, varicela-zoster (VZV) o adenovirus<sup>13</sup>.

Dada la importancia etiológica de los virus del papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en la génesis del carcinoma de cérvix<sup>14</sup>, son especialmente significativos los resultados obtenidos con la inmunización de ratones con fibroblastos transfectados con su gen E7, que les protege contra el desarrollo de células tumorales que lo expresan<sup>15</sup>.

### **Optimización de la quimioterapia citotóxica**

Los enfoques convencionales de la quimioterapia citotóxica han alcanzado desgraciadamente una meseta en su eficacia, que sólo puede evolucionar positivamente con el hallazgo de nuevos fármacos todavía insospechados<sup>8</sup>. La transferencia de genes puede ser, sin embargo, de gran ayuda, evitando la toxicidad de los fármacos sobre las células normales y permitiendo su máxima actividad en las células tumorales.

### **Inhibición de la toxicidad hematopoyética**

La transfección de células progenitoras hematopoyéticas con determinados genes que se sabe que confieren resistencia a uno o a varios agentes quimioterápicos convencionales puede conferir una protección específica de la hematopoyesis ante esos agentes, permitiendo su efecto antitumoral máximo<sup>16</sup>. Las células CD34 pueden procesarse *in vitro* reinfundiéndolas posteriormente. Se ha conseguido ya mejorar enormemente los rendimientos y, aunque la duración de los genes transferidos es relativamente corta, esto último no es un inconveniente, ya

que no interesa obtener una duración de la resistencia muy superior a la de una quimioterapia intensiva con intención radical, que siempre es corta, teniendo en cuenta la posibilidad de una segunda neoplasia hemopoyética.

Por vía experimental se han transferido con éxito práctico el gen de la resistencia pleiotrópica *MDR1*, que confiere resistencia a las antraciclinas, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas y otros importantes fármacos<sup>17</sup>, o, con un ámbito más específico, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), con vistas a un tratamiento con dosis altas de metotrexato<sup>18</sup>. Se ha iniciado así un camino que resulta ser altamente prometedor, que sólo espera la aclaración de algunos problemas de rendimiento y seguridad para entrar en ensayos clínicos en fase I con *MDR1*<sup>19</sup>.

La utilización de los factores de crecimiento G-CSF y GM-CSF en clínica es un procedimiento saludable para evitar las neutropenias complicadas durante la quimioterapia convencional. También se ha conseguido una buena estimulación de la hemopoyesis con la transferencia del gen para GM-CSF<sup>20</sup>. Esto podría ser beneficioso para evitar la administración repetida del factor al paciente en tratamiento, pero puede resultar, por el contrario, muy peligroso, dada la enorme mielosupresión que la quimioterapia citotóxica produce en circunstancias parecidas, como es el caso de su administración concomitante con GM-CSF<sup>21</sup> o G-CSF<sup>22</sup>.

### **Quimioterapia citotóxica selectiva**

El sueño dorado de los clínicos puede ser pronto una realidad tangible gracias a la manipulación genética, a través de una estrategia de desarrollo inicial muy reciente, denominada, por su mecanismo específico, quimioterapia enzima/profármaco dirigida por virus<sup>6</sup>.

La base de esta estrategia radica esencialmente en dos premisas cruciales, siendo la primera de ellas la existencia en la naturaleza de enzimas, no presentes en las células de mamífero, capaces de actuar sobre sustratos específicos, que las enzimas existentes en éstas, aun en el caso de que sean análogas, no pueden metabolizar.

Este es el caso de la timidincinasa del virus del herpes simple y el agente antiviral ganciclovir, un nucleósido sintético derivado de la guanina, no metabolizado por la timidincinasa de las células normales, pero que aquélla convierte específicamente en un inhibidor de la síntesis de DNA, letal para la replicación del virus

y para la célula infectada. Lo más interesante es que este fenómeno puede reproducirse en células tumorales transfectadas con vectores retrovirales portadores del gen de la timidincinasa del virus del herpes<sup>23</sup>. Con este enfoque se ha comenzado un ensayo clínico en el que se administran por vía intraperitoneal células de una línea de cáncer de ovario, transfectadas *in vitro* con el gen e irradiadas letalmente para evitar su injerto, a pacientes con cáncer ovárico que se tratan simultáneamente con ganciclovir, con la esperanza de que el metabolito activo de éste, liberado de las células transfectadas, pueda actuar sobre las células tumorales de la paciente<sup>2</sup>.

También, por su parte, la timidincinasa del virus varicela-zoster es capaz de metabolizar específicamente la 6-metoxipurina-arabinonucleósido (ara-M) dando lugar a ara-ATP, selectivamente tóxico para las células infectadas por el virus, ya que no es metabolizado por la timidincinasa celular, lo que le convierte también en un candidato excelente para su transferencia a células tumorales<sup>6</sup>. Otro ejemplo significativo es el de la enzima bacteriana citosina deaminasa, que las células animales no expresan y que es capaz de convertir un inocuo agente antifúngico como la 5-fluorocitosina en el antimitabólico 5-fluorouracilo, selectivamente letal para las células de mamífero transfectadas con el gen de la enzima<sup>24</sup>.

La segunda premisa crucial para la optimización de este nuevo enfoque de la quimioterapia, lo que le confiere su estricta especificidad, es la posibilidad de construir vectores retrovirales específicos, capaces de transportar e inducir la expresión de los genes de estas enzimas *únicamente a las células que interesa destruir y a ninguna otra*.

Esto se puede conseguir aprovechando la cualidad de muchas células tumorales de expresar amplia y selectivamente determinados genes que no son esenciales para la supervivencia, como la alfafetoproteína (hepatomas y teratomas), antígeno prostático específico (cáncer de próstata), calcitonina (cáncer medular del tiroides), enolasa neuronal específica (carcinoma microcítico), *c-erbB-2* (carcinomas de mama, ovario y digestivos), etc.<sup>3</sup>. Si el vector retroviral, ya con un estrecho espectro de receptividad tisular por sus propios promotores, es también portador de los promotores propios del gen que se está expresando muy específicamente en el tumor a tratar y no en las células normales, incluso del mismo tejido, la toxicidad selectiva del profármaco queda garantizada.

Esto hace realmente posible discriminar bien, por lo menos *in vitro*, entre células de hepatoma y hepatocitos normales con vectores que contienen timidincinasa de virus de varicela-zoster acoplada con promotores de seroalbúmina o alfafetoproteína. La toxicidad del profármaco ara-M es selectiva para los hepatocitos cuando la transfección se realiza con el vector que contiene promotores de seroalbúmina y para las células del hepatoma cuando se realiza con el vector que lleva acoplados los promotores de la alfafetoproteína<sup>6</sup>. El desarrollo de este tipo de vectores puede revolucionar no sólo la quimioterapia con fármacos citotóxicos, sino toda la tecnología y proyección de la transferencia génica para el tratamiento del cáncer.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-813.
- Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992; 357: 445-460.
- Gutiérrez AA, Lemoine NR, Sikora K. Gene therapy for cancer. *Lancet* 1992; 339: 715-721.
- Vicente J. Oncogenes y genes oncosupresores: la base molecular del cáncer. *Rev Cancer* 1992; 6: 111-148.
- Temin HM. Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J Med Virol* 1990; 31: 13-17.
- Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8.039-8.043.
- Johnson P, Gray D, Mowat M, Benchimol S. Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1-11.
- Vicente J, Lobo F, Dómine M, Fernández-Chacón C, González-Agéitos A, García-Rico E. La nueva quimioterapia del cáncer. En: *Controversias en Oncología II*. Barcelona: Doyma, 1993. En prensa.
- Rosenberg SA. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 180-199.
- Aebersold P, Hyatt C, Johnson S, Hines K, Korkac L, Sanders M et al. Lysis of autologous melanoma cells by tumor-infiltrating lymphocytes: association with clinical response. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 932-937.
- Pardoll D. Immunotherapy with cytokine gene-transduced tumor cells: the next wave in gene therapy for cancer. *Cur Opin Oncol* 1992; 4: 1.124-1.129.
- Livingston PO. Construction of cancer vaccines with carbohydrate and protein (peptide) tumor antigens. *Curr Op Immunol* 1992; 4: 624-629.
- Morgan AJ. Epstein-Barr virus vaccines. *Vaccine* 1992; 10: 563-571.
- Bosch FX, Muñoz N. Human papillomavirus and cervical neoplasia: a critical review of the epidemiological evidence. En: Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM, editores. *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lyon: IARC Scientific Publications, 1989; 94: 135-151.
- Chen L, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human papilloma virus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 110-114.
- Bertino JR. «Turning the tables»-Making normal marrow resistant to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1.234-1.235.
- McLachlin JR, Eglitis MA, Ueda K, Kantoff PW, Pastan IH, Anderson F, Gottesman M. Expression of a human complementary DNA for the multidrug resistance gene in murine hematopoietic precursor cells with the use of retroviral gene transfer. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1.260-1.263.
- Corey CA, De Silva AD, Holland CA, Williams DA. Serial transplantation of methotrexate-resistant bone marrow: protection of murine recipients from drug toxicity by progeny of transduced stem cells. *Blood* 1990; 75: 337-343.
- Reynolds T. RAC defers gene therapy approval. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 13-14.
- Keith WN, Brown R, Pragnell IB. Retrovirus mediated transfer and expression of GM-CSF in haematopoietic cells. *Br J Cancer* 1990; 62: 388-394.
- Kaplan LD, Kahn JO, Crowe S, Northfelt D, Neville P, Grossberg H et al. Clinical and virologic effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients receiving chemotherapy for human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 1991; 9: 929-940.
- Meropol NJ, Miller LL, Korn EL, Braitman LE, MacDermott ML, Schuchter LM. Severe myelosuppression resulting from concurrent administration of granulocyte colony-stimulating factor and cytotoxic chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1.201-1.203.
- Moolter FL, Wells JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 297-300.
- Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 33-37.

## DISCUSIÓN

M. HERNÁNDEZ-BRONCHUD: De las cuatro opciones que ha planteado: inhibición de oncogenes reactivos, transferencia de genes supresores, inmunomodulación y optimización de la quimioterapia, ¿cuál cree usted que puede tener más porvenir en cuanto a su aplicación clínica?

J. VICENTE: Yo diría que, a corto plazo, la optimización de la quimioterapia, ya que estamos habituados a utilizar la quimioterapia, conocemos sus efectos y es la opción más tangible en este momento. En segundo lugar, y de forma paralela, situaría las técnicas de inmunomodulación aunque todavía se debe avanzar en su tecnología. Las vacunas antitumorales serán pronto una realidad especialmente en aquellas neoplasias relacionada con virus y en concreto me refiero a las vacunas virales para herpes-virus en el carcinoma de cuello uterino y el virus de Epstein-Barr en el caso de los linfomas de Burkitt y los carcinomas nasofaríngeos indiferenciados. En tercer lugar, la modificación de la expresión de los oncogenes. En los EE.UU. existe una línea de investigación en fase experimental avanzada para evaluar el tratamiento de la leucemia mieloide crónica con el oligonucleótido *bcr/abl*, que es cortísimo y absolutamente específico. Posiblemente también, la modulación de la resistencia de la médula ósea con el empleo de vectores virales para la transferencia del gen MDRI.

A. CANO: Es obvio que este tipo de técnicas son bastante costosas, tanto humana como económicamente, mi pregunta es: ¿hasta qué punto en España, con la situación actual de los hospitales, podrán aplicarse de una forma efectiva?

J. VICENTE: Nuestro deseo sería que se pudieran aplicar muy pronto. Lo que ocurre es que no todas están en la misma fase de evolución

y algunas requerirán todavía años de investigación antes de pasar a la clínica. Quizá lo más inmediato sea el último punto al que me he referido antes y que probablemente permitirá ahorrar muchos autotrasplantes medulares, que tienen un coste enorme y grandes inconvenientes para el paciente. En un futuro, una vez obtenidas las células CD34 mediante una leucoféresis, podrán reinfundirse con la transferencia del gen.

M. HERNÁNDEZ-BRONCHUD: Quisiera hacer una pequeña observación: las células CD34 son unos precursores pluripotentes hemopoyéticos, pero no se ha demostrado, y parece ser que no se da el caso de que sean realmente las que tienen la capacidad de autorrenovación. Por tanto, creo que quizás antes de llegar a una aplicación clínica en este campo convendría definir qué células se deben transformar.

J. VICENTE: Lo ideal sería transformar las células primordiales, lo que ocurre es que en este momento no se pueden identificar. A lo más que llegamos es a identificar las CD34 positivas y CD33 negativas, que son las que utilizamos en el trasplante de células periféricas.

G. CAPELLA: En principio a mí me daría un poco de miedo transfectar y meter dentro de una persona un vector viral. ¿Qué tipo de obstáculos piensa usted que pueden surgir teóricamente?

J. VICENTE: Se debe tener en cuenta que hablamos de enfermedades incurables que, en general, son mortales en un plazo de tiempo breve. Por otra parte, no parece que en este momento el empaquetamiento de virus no replicadores tenga graves inconvenientes. El virus no se va a diseminar por el organismo, sino que estamos inyectando un virus dirigido a determinadas células, la mayoría de las cuales son tumorales.