

Tratamiento génico del hepatocarcinoma

BRUNO SANGRO GÓMEZ-ACEBO

Unidad de Hepatología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. España.

HERRAMIENTAS DEL TRATAMIENTO GÉNICO

El tratamiento génico es el área terapéutica más joven y reúne a todas las formas de tratamiento de las enfermedades humanas que tienen en común la utilización de material genético. En general, ese material genético se puede emplear para restaurar una función celular perdida, inducir una función nueva o interferir con una función ya existente y nociva. En cualquier caso, para ejecutar su tarea, el material genético debe alcanzar la célula diana, de forma que material, célula y método de transferencia son los 3 elementos con los que se conforman las diferentes estrategias de tratamiento génico. La acción de transferir el material genético a la célula se conoce como transducción y el gen que se transduce es el transgén.

El material genético que puede utilizarse es muy diverso (tabla 1). La transferencia de material genético a las células diana puede hacerse *ex vivo* o *in vivo*. La transferencia *ex vivo* se realiza mediante el aislamiento de células del tumor o del sistema inmunológico, su cultivo y transducción *in vitro* y su posterior reintroducción en el individuo. En general, para el tratamiento del cáncer el interés de este procedimiento se centra en la utilización de células modificadas para estimular la respuesta inmunitaria, que actúan a modo de vacunas terapéuticas.

El tratamiento génico *in vivo* consiste en la introducción directa del material genético en el paciente y supone ventajas obvias desde el punto de vista práctico.

Para transducir células se utilizan vehículos o vectores, cuya misión es proteger el material genético de su degradación antes de que alcance el núcleo. Los vectores pueden ser de dos tipos: virales y no virales (tabla 2). Los vectores virales se construyen sustituyendo porciones del genoma viral que resultan imprescindibles para la replicación del virus por el transgén en cuestión. Los virus recombinantes así obtenidos son capaces de penetrar en la célula y de hacer llegar al núcleo el transgén, pero no de replicarse indiscriminadamente y dar lugar a una infección viral en el paciente. La lista de virus utilizados con este fin aumenta cada año, pero los virus más empleados son los retrovirus y adenovirus. Los retrovirus se emplean habitualmente para la transferencia *ex vivo*, su principal ventaja es que la expresión es duradera y su inconveniente mayor, que la célula ha de dividirse para que el transgén se integre y exprese. Por el contrario, los adenovirus infectan células en reposo y transducen eficazmente tanto el hígado peritumoral como los tumores cuando se administran por vía intratumoral, intraarterial o intravenosa, pero su

Puntos clave

- El tratamiento génico consiste en transferir material genético a las células de un determinado tejido con la intención de corregir una función defectuosa, aportar una función nueva o interferir con una función nociva.
- El material genético suele estar compuesto por genes naturales o quiméricos y, para lograr transferirlos a las células diana *-in vivo* o *ex vivo*- se emplean vectores muy diversos, como virus defectivos y liposomas, entre otros.
- Las estrategias más desarrolladas de tratamiento génico del hepatocarcinoma persiguen la corrección de las alteraciones moleculares propias de las células malignas, la producción selectiva en el seno del tumor de sustancias citotóxicas o la inducción de una respuesta inmunológica antitumoral eficaz.
- La viroterapia es una forma de tratamiento desarrollada en paralelo al tratamiento génico, que consiste en la destrucción del tumor por virus modificados genéticamente, para que se repliquen de forma selectiva en las células cancerosas.
- Los obstáculos actuales al desarrollo clínico del tratamiento génico del hepatocarcinoma tienen que ver, sobre todo, con los sistemas de transferencia génica, que son aún poco eficaces, demasiado frágiles o insuficientemente seguros.

principal inconveniente es que la expresión es transitoria porque la respuesta inmunitaria antiviral destruye las células infectadas. Los vectores no virales son un grupo heterogéneo de vehículos, cuyo principal exponente son los liposomas, con menor eficacia de transducción pero con las ventajas de no ser inmunogénicos y tener un perfil de toxicidad bajo y bien conocido.

POSIBILIDADES DE TRATAMIENTO GÉNICO DEL HEPATOCARCINOMA

El tratamiento génico del hepatocarcinoma (HCC) se puede abordar utilizando como células diana las propias células tumorales, el tejido hepático peritumoral o las células que participan en la respuesta inmunitaria antitumoral, y como material genético distintos transgenes que se resumen en la figura 1. Los distintos tipos de tratamiento génico los analizaremos sucintamente a continuación.

Corrección de alteraciones genéticas

En el HCC, como en la mayoría de las neoplasias avanzadas, es frecuente que se pierda por distintos mecanismos la función del gen supresor de tumores p53. En cultivos celulares, restaurar esta función perdida transfiriendo una versión correcta del gen hace que las células malignas dejen de proliferar y se hagan más sensibles a la quimioterapia^{6,7}. También en modelos animales de HCC la administración intratumoral⁸ o intraarterial hepática⁹ de vectores adenovirales que contienen el gen *p53* tiene efecto antitumoral. En el único ensayo clínico publicado, pacientes con HCC recibieron por vía intratumoral cantidades variables de un plásmido con el gen de *p53*¹⁰ y, aunque el objetivo del estudio era valorar la seguridad de esta alternativa, se observó remisión tumoral en algunos pacientes.

Quimioterapia selectiva

La limitación principal de los fármacos antineoplásicos radica en que las dosis que producen efecto antitumoral generan también efectos adversos por dañar tejidos no tumorales. Una solución a este problema consiste en transducir selectivamente el tumor con genes que fabriquen enzimas capaces de convertir formas inactivas de un fármaco en metabolitos tóxicos (tabla 3). De todos los genes capaces de cumplir esta función, el más estudiado ha sido el de la timidín cinasa (tk) de los virus del grupo herpes que transforma el antiviral ganciclovir en un agente antitumoral. Por acción de esta tk viral, el ganciclovir se activa y es así capaz de interferir con la síntesis del ADN y producir la muerte de células en división. Además, el efecto antitumoral se amplifica gracias a la transferencia del ganciclovir activado a través de uniones intercelulares¹¹ y a la puesta en marcha de una reacción inmuno-

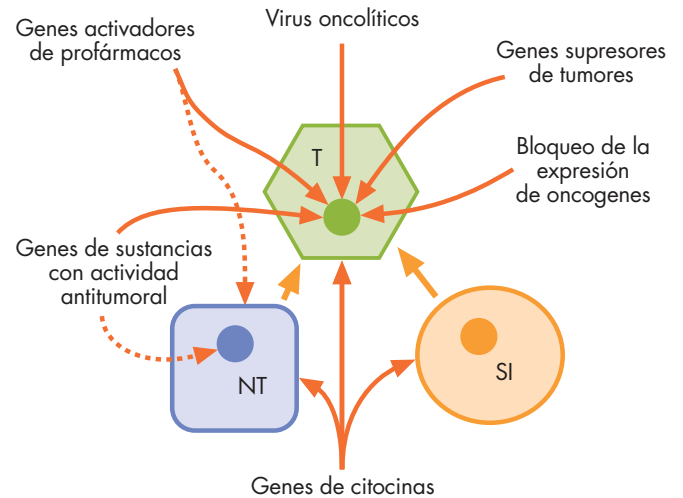


Figura 1. Posibilidades de tratamiento génico del hepatocarcinoma. En las distintas estrategias, para conseguir una acción antitumoral, el material genético puede transferirse al propio tumor (T), al tejido hepático que lo rodea (NT) o a las células del sistema inmunológico (SI).

lógica¹². El sistema tk es eficaz frente al HCC, tanto en cultivos celulares¹³ como en diferentes modelos animales^{4,14}. En cuanto a la aplicación en pacientes con tumores hepáticos, estas estrategias de genes activadores de profármacos han demostrado ser seguras mediante inyección intratumoral en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal¹⁵ y su eficacia y seguridad en

Tabla 1. Material genético utilizable en el tratamiento génico del cáncer

| | |
|---|--|
| Genes naturales (codifican para proteínas naturales que tienen un efecto biológico conocido) | |
| Genes de proteínas defectuosas o ausentes | Genes supresores de tumores, como <i>p53</i> o <i>RB</i> |
| Genes de moléculas inmunoestimulantes | citocinas, quimiocinas, moléculas de coestímulo, moléculas HLA |
| Genes "suicidas" | Enzimas capaces de transformar profármacos inocuos en agentes citotóxicos antitumorales |
| Genes de proteínas con efecto antitumoral | Proteínas antiangiogénicas (endostatina), inhibidoras del crecimiento tumoral (IGF), etc. |
| Genes quiméricos (se diseñan en el laboratorio y pretenden interferir con funciones específicas o relevantes de las células tumorales) | |
| Anticuerpos de cadena simple | Capaces de unirse específicamente a un antígeno (v.g. la proteína de un oncogén), al que bloquean por quedar retenidos dentro de la célula |
| Proteínas dominantes mutadas | Similares a proteínas reguladoras, conservan la capacidad de unión al ADN, por lo que compiten con las proteínas no mutadas, pero carecen del efecto regulador |
| Material subgenómico | |
| Ribozimas | Pequeñas moléculas de ARN de secuencia complementaria a la de otros ARN diana, a los que se unen específicamente, dotados de una actividad catalítica que les permite destruir el ARN al que se unen |
| Moléculas antisentido | Oligonucleótidos que, por ser complementarios, se unen a secuencias específicas de ADN o ARN y bloquean su expresión |
| Moléculas señuelo | Moléculas de ADN que secuestran por unión específica las proteínas reguladoras e impiden su efecto biológico |

el tratamiento del HCC se están estudiando en un ensayo clínico en curso por parte de nuestro grupo.

Inmunoterapia génica

La incapacidad del sistema inmunitario para acabar con un tumor depende tanto de la incapacidad de los antígenos tumorales para lograr estimular una respuesta eficaz como de la ineficacia de los mecanismos efectores encargados de eliminar las células tumorales. Estas alteraciones pueden intentar corregirse mediante el tratamiento génico. La estrategia más estudiada es la que consiste en lograr una producción intensa en el seno del tumor de sustancias con efecto inmunoestimulante, fundamentalmente citocinas, como TNF- α ¹⁶, interleucina (IL) 2 o GM-CSF¹⁷ y, sobre todo, IL-12. Utilizando vectores adenovirales, la transferencia de los genes de la IL-12 tanto al propio tumor como al hígado no tumoral se traduce en un efecto antitumoral muy intenso y reproducible¹⁸⁻²². Recientemente, nuestro grupo ha concluido el primer ensayo clínico en el que pacientes con HCC y otros tumores hepáticos secundarios recibieron la administración intratumoral de un vector adenoviral portador de los genes de la IL-12. Aunque este ensayo sólo perseguía evaluar la seguridad del producto y buscar las dosis para subsiguientes estudios de eficacia, también se observaron indicios de

actividad antitumoral, como infiltración del tumor por linfocitos citotóxicos y estabilización o remisión parcial de las lesiones, en una porción relevante de los pacientes con HCC.

Una alternativa interesante es la que pretende estimular la respuesta inmune antitumoral modificando genéticamente las células del propio sistema inmunológico, para que ejerzan sus funciones con mayor eficacia. Las células dendríticas, por ejemplo, son eficaces presentadoras de antígenos que pueden ingenierizarse para que presenten antígenos tumorales mediante la transducción de genes que codifiquen para antígenos tumorales relevantes, como la α -fetoproteína²³, o bien para que produzcan citocinas que promuevan su proliferación y activación, como la IL-12²⁴. Las células dendríticas así modificadas pueden inducir respuestas antitumorales enérgicas frente al HCC metastásico y esta estrategia se está estudiando en ensayos clínicos.

Viroterapia

Es una forma peculiar de tratamiento de los tumores, se incluye habitualmente dentro del tratamiento génico por haberse desarrollado a su amparo. De la misma forma que se crea un vector viral sin capacidad alguna de replicación, un virus puede modificarse genéticamente para que se replique selectivamente en el tumor y pueda infectar y eliminar las células neoplásicas de una forma restringida. Para conseguir esta selectividad se acude a ciertos cambios fenotípicos de las células malignas, como la activación de oncogenes o la pérdida de función de genes supresores de tumores. El mejor ejemplo es el de los adenovirus delecionados en E1B²⁵. Para replicarse, los adenovirus salvajes bloquean la función de p53 gracias a la proteína E1B. Un adenovirus al que le falte esta proteína será incapaz de replicarse en una célula normal, pero no en una célula maligna en la que p53 no funcione adecuadamente. La inyección intratumoral de este virus oncolítico a pacientes con HCC ha revelado que el tratamiento es seguro y que parece tener cierta actividad antitumoral²⁶. Pero estos virus de replicación selectiva pueden constituirse en excelentes vectores de tratamiento génico cuando portan un transgén, de forma que permiten la transducción de las células tumorales que van infectando.

Tabla 2. Vectores de tratamiento génico

| Virales | No virales |
|----------------------|--------------------------|
| Retrovirus | ADN plasmídico o desnudo |
| Adenovirus | Complejos ADN-proteínas |
| Virus adenoasociados | Liposomas |
| Lentivirus | Inmunoliposomas |
| Herpesvirus | Virosomas |
| Vacciniavirus | Polietanolinas |
| Baculovirus | Partículas coloidales |
| Alfavirus | Chitosan |

Tabla 3. Enzimas activadoras de profármacos utilizadas en el tratamiento con genes "suicidas"

| Enzima | Profármaco | Fármaco |
|--------------------------------------|---|---------------------|
| Enzimas no humanas | | |
| Timidín cinasa viral | Ganciclovir | Ganciclovir-3P |
| Citocina deaminasa | 5-Fluorocitosina | 5-Fluorouracilo |
| Carboxipeptidasa G2 | CJS278 | Adriamicina |
| Nitrorreductasa | CB1954 | Metabolito activo |
| Metionina α , γ -liasa | Selenometionina | Metilselenol |
| Carboxilesterasa | Irinotecan | SN-38 |
| Enzimas humanas | | |
| Citocromo P450 | Ifosfamida Ciclofosfamida Ipomeanol | Metabolitos activos |
| Deoxicitidina cinasa | Citarabina Gemcitabina | Metabolitos activos |

CJS278: N-[4-[L-glutamylcarbonilamino]benziloxycarbonil]adriamicina; CB1954: 5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamida.

OBSTÁCULOS ACTUALES EN EL TRATAMIENTO GÉNICO DEL HEPATOCARCINOMA

El desarrollo del tratamiento génico del cáncer en la última década ha sido rápido e intenso, de forma que son miles las personas que han recibido tratamiento en el marco de ensayos clínicos. En los primeros años, a mediados los noventa, se levantaron expectativas poco realistas y se pasó rápidamente de las buenas experiencias en animales a la realización de ensayos clínicos que defraudaron las esperanzas generadas.

Los principales obstáculos encontrados tienen que ver más con las herramientas que con las estrategias. En general, los vectores disponibles carecen de tropismo por el tejido tumoral, son ávidamente degradados tras su administración intravenosa, no son capaces de alcanzar tumores avanzados en los que existe una auténtica barrera defensiva estructural y la expresión del transgén que incorporan se ve limitada por la eliminación mediada inmunológicamente de la célula infectada si antes no lo es por el silenciamiento del promotor. Sin embargo, estos obstáculos, que parecen insalvables para intentar la corrección de alteraciones genéticas en hepatocarcinomas ampliamente metastásicos, pueden solventarse en parte adaptando la estrategia a las circunstancias. Así, la administración intratumoral repetida puede ser una alternativa para el tratamiento de hepatocarcinomas únicos de gran tamaño, no susceptibles de ablación percutánea o cirugía. Y para el tratamiento de la enfermedad hepática extendida puede recurrirse a la estimulación de la respuesta inmune antitumoral con alguna de las estrategias descritas, a la acción citolítica de los virus de replicación selectiva o a la transducción del tejido peritumoral. Esto último puede lograrse en modelos animales utilizando vectores con hepatotropismo, como los adenovirus, o mediante la denominada transducción hidrodinámica, que consiste en inyectar ADN plasmídico y bloquear el drenaje venoso hepático²⁷. Con todo, algunos productos de tratamiento génico han logrado inducir efectos antitumorales biológicamente relevantes, lo que indica que la mejora de las herramientas –vectores y promotores fundamentalmente– seguramente se traducirá en la consecución de una eficacia clínicamente relevante.

BIBLIOGRAFÍA

● Importante ●● Muy importante

■ Ensayo clínico controlado

1. Raper SE, Grossman M, Rader DJ, et al. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia [see comments]. *Ann Surg* 1996;223:116-26.
2. ● Kalpana GV. Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Semin Liver Dis* 1999;19:27-37.
3. Topf N, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Regional "pro-drug" gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther* 1998;5:507-13.
4. ● Qian C, Idoate M, Bilbao R, et al. Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Human Gene Ther* 1997;8:349-58.
5. Davis ME. Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:128-31.
6. Qian C, Prieto J. Growth suppression of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells by the introduction of wild-type p53 (wt-p53). *J Hepatol* 1994;21(Suppl 1):9.
7. Xu GW, Sun ZT, Forrester K, Wang XW, Coursen J, Harris CC. Tissue-specific growth suppression and chemosensitivity promotion in human hepatocellular carcinoma cells by retroviral-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Hepatology* 1996;24:1264-8.
8. Choi JY, Park YM, Byun BH, et al. Adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy against subcutaneous HuH7 hepatoma cell line nodule of nude mice. *J Korean Med Sci* 1999;14:271-6.

9. Anderson SC, Johnson DE, Harris MP, et al. p53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus. *Clin Cancer Res* 1998;4:1649-59.
10. Habib NA, Mitry RR, Sadri R. p53 and gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Adv Experiment Med Biol* 1998;451:499-504.
11. Kuriyama S, Nakatani T, Masui K, et al. Evaluation of prodrugs ability to induce effective ablation of cells transduced with viral thymidine kinase gene. *Anticancer Res* 1996;16:2623-8.
12. Kianmanesh AR, Perrin H, Panis Y, et al. A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor [see comments]. *Hum Gene Ther* 1997;8:1807-14.
13. Qian C, Bilbao R, Bruna O, Prieto J. Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology* 1995;22:118-23.
14. Sangro B, Bustos M, Barajas M, et al. Effective and safe gene therapy of experimental liver cancer by intratumoral injection of a defective adenovirus containing the thymidine kinase gene. *J Hepatol* 1999;30 (Suppl 1):159.
15. ● Sung MW, Yeh HC, Thung SN, et al. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2001;4:182-91. (EC)
16. Cao G, Kuriyama S, Du P, et al. Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by in vivo tumor necrosis factor alpha gene transfer [see comments]. *Gastroenterology* 1997;112:501-10.
17. Yoshida H, Enomoto H, Tagawa M, et al. Impaired tumorigenicity and decreased liver metastasis of murine neuroblastoma cells engineered to secrete interleukin-2 or granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Gen Ther* 1998;5:67-73.
18. Drodzdzik M, Qian C, Xie X, et al. Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:279-86.
19. Barajas M, Mazzolini G, Genove G, et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001;33:52-61.
20. Mazzolini G, Narvaiza I, Bustos M, et al. Alpha(v)beta(3) integrin-mediated adenoviral transfer of interleukin-12 at the periphery of hepatic colon cancer metastases induces VCAM-1 expression and T-cell recruitment. *Mol Ther* 2001;3:665-72.
21. Mazzolini G, Gil A, Alzuguren P, et al. Interleukin 12 gene transfer to the non-tumoral tissue inhibits growth of liver metastases from colorectal cancer. *Mol Ther* 2001;3:S376.
22. Mazzolini G, Qian C, Narvaiza I, et al. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther* 2000;11:113-25.
23. ● Vollmer CM, Jr., Eilber FC, Butterfield LH, et al. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:3064-7.
24. ● Meleiro I, Duarte M, Ruiz J, et al. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther* 1999;6:1779-84.
25. ●● Heise C, Sampson Johannes A, Williams A, McCormick F, von Hoff DD, Kimm DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytotoxicity and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3:639-45.
26. Habib N, Salama H, Abd-El-Latif-Abu-Median A, et al. Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Gen Ther* 2002;9:254-9.
27. Liu D, Knapp JE. Hydrodynamics-based gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:192-7.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Sangro B, Herraiz M, Prieto J. Gene therapy of neoplastic liver diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:135-48.

Completa revisión de las herramientas y estrategias desarrolladas para el tratamiento génico del cáncer hepático, tanto primario como metastásico.

Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, Nakabayashi H, McGarrity G, Tamaoki T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression. *Cancer Res* 1995;55:5283-7.

Una de las primeras publicaciones sobre el empleo de promotores específicos de tumor para conseguir que la expresión génica se limite al tejido tumoral, evitando así los efectos de la expresión no deseada del transgén en otros órganos.

Kirn D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther* 2001;8:89-98.

Interesante descripción y comentario del desarrollo preclínico y clínico de un virus oncolítico.

Gambhir SS, Barrio JR, Phelps ME, Lyer M, Namavari M, Satyamurthy N, et al. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2333-8.

Descripción de un sistema de visualización de la expresión génica in vivo que utiliza la tomografía por emisión de positrones, de gran interés por sus posibilidades de aplicación clínica.