

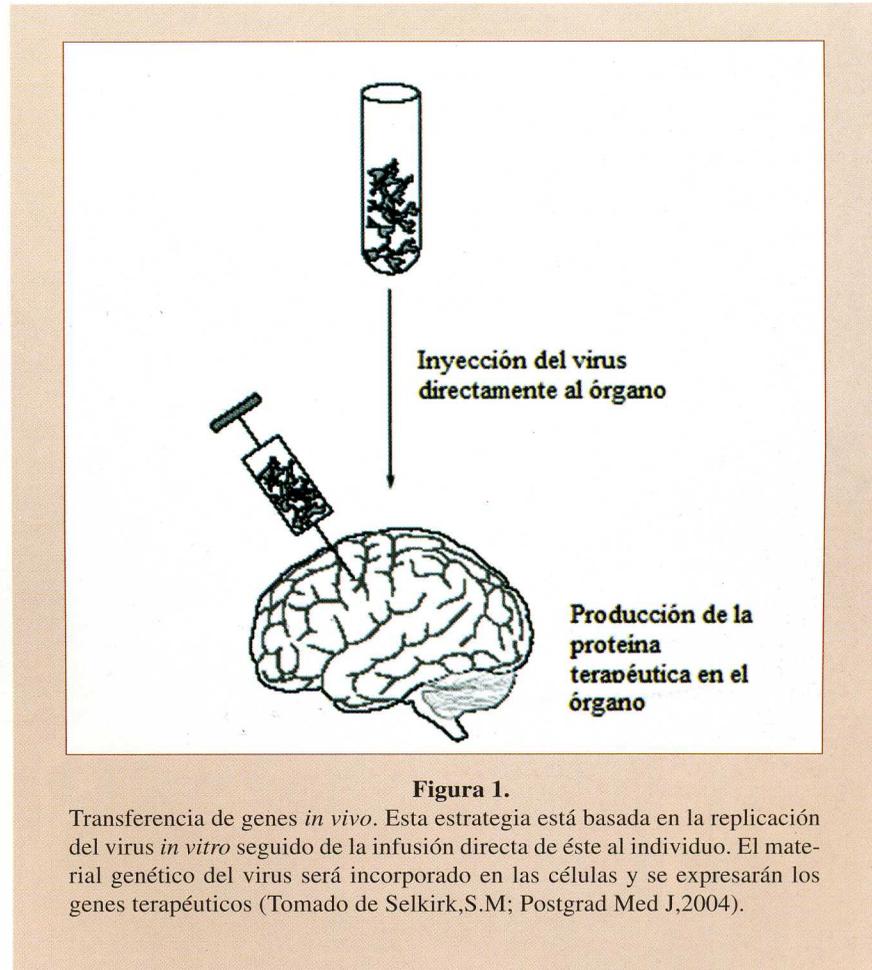
# TERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.

Dr. Rodolfo Paredes E. (M.V.)  
Dra. Lisette Lapiere A. (M.V.)  
Dr. Leonardo Sáenz I. (M.V.)  
Dra. Daniela Iragüen C. (M.V.)

Durante los últimos 40 años los avances en la biología molecular han sido significativos, otorgando importantes bases para el desarrollo de terapias innovadoras y eficientes. Gracias a los descubrimientos de los genes y de sus funciones, ha sido posible identificar los blancos necesarios para el tratamiento de diversas enfermedades. Es por esto, que se ha intentado diseñar herramientas que permitan modificar los genes o sus productos con el fin de evitar, aliviar o curar una enfermedad.

La terapia génica tiene como base la transferencia de genes, en la cual el material genético (ADN), es incorporado a las células de un individuo con el objetivo de corregir una deficiencia génica. Estos genes pueden ser producidos en grandes cantidades en un laboratorio, conocido como ADN recombinante, para luego de ser clonados, ser transferidos a las células huésped mediante vectores. El objetivo en este tipo de terapias es que el ADN introducido mantenga su expresión en el tiempo, evitando la necesidad de tratamientos repetidos. Para lograr este objetivo, se han diseñado distintas estrategias, como por ejemplo la utilización de vectores virales, los que otorgan la ventaja de mejorar la entrega del transgen (material genético foráneo) a las células blanco, gracias a su capacidad infectante, escasa patogenicidad y a la posibilidad de infectar células huésped específicas.

Entre los vectores no virales utilizados se incluyen una gran variedad de liposomas positivamente cargados; ADN desnudo en forma de plasmidio, que puede acceder al núcleo de las células y expresarse; microesferas producidas a partir de copolímeros de



polianhídridos de ácido fumárico y sebáico. Estas últimas ofrecen la posibilidad de una terapia génica activa por vía oral. Sin embargo, los vectores anteriormente mencionados están limitados por su baja eficiencia de transferencia del gen.

Otro enfoque terapéutico se basa en el bloqueo de la expresión de oncogenes y sus productos, en aquellas enfermedades en las que existe una alteración en su regulación, como lo que ocurre en algunos tipos de cáncer. La estrategia se fundamenta en la utilización de secuencias génicas cortas (oligonucleótidos) que tienen la capa-

cidad de unirse complementariamente al ADN o ARN de los genes blanco, impidiendo de esta forma la traducción a proteínas.

## PRINCIPALES ESTRATEGIAS PARA INCORPORAR GENES EN LOS PACIENTES.

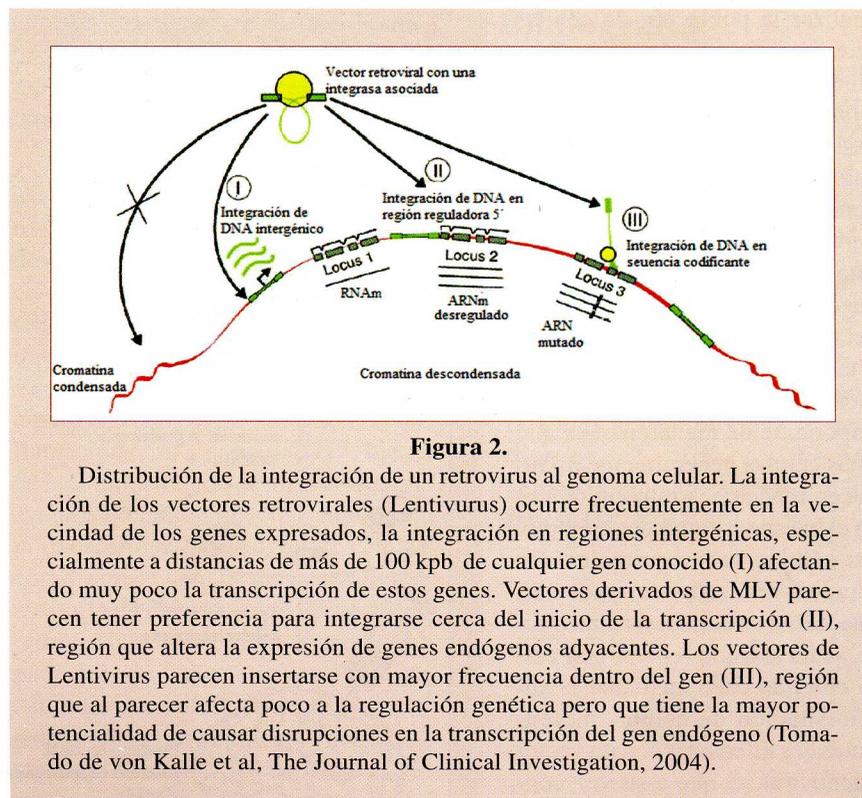
La estrategia *in vivo* (Figura 1) consiste en inyectar una suspensión que contiene el vector portador del gen terapéutico directamente en el paciente, ya sea por vía oral o parenteral. Para

esto, el vector debe tener la facultad de distribuirse en el organismo y de reconocer las células blanco. Idealmente, el vector debe ser seguro, eficaz y selectivo. Entre los vectores víricos tenemos:

**Vectores retrovirales:** derivados del Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV). Tienen la ventaja de que sus efectos son permanentes en el tiempo, efecto debido principalmente a que tienen la capacidad de insertarse en el ADN de la célula huésped, de manera que traspasan la información genética a cada célula hija mediante la división celular. La desventaja que presenta este tipo de vectores, es que la inserción del material genético puede ser aleatoria en el cromosoma, produciendo efectos no deseados incluyendo los producidos en las células germinales. Por otro lado, poseen una baja eficiencia de infección y además no son capaces de infectar células que no se encuentran en activa división, lo que limita su utilización en algunos tipos celulares, como por ejemplo, el tejido nervioso (Figura 2).

Dentro del grupo de vectores retrovirales, los lentivirus poseen la capacidad de infectar células en división o que se encuentran en  $G_0$ . Son capaces de atravesar las membranas celulares y nucleares e integrarse en el genoma, por lo que sus efectos son de largo plazo y además son tejido específico. Sumado a esto, su baja capacidad antigénica lo convierte en uno de los más promisorios vectores disponibles. Una desventaja en el uso de este tipo de vectores, es que generalmente son derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y que, a pesar de que se les ha eliminado su característica patogénica, muchas veces mantienen la capacidad de generar recombinaciones con otros RNAvirus, aumentando el riesgo de mutaciones, con efectos desconocidos.

**Vectores adenovirales:** corresponden a vectores más selectivos, lo que les confiere más seguridad en su utili-



**Figura 2.**

Distribución de la integración de un retrovirus al genoma celular. La integración de los vectores retrovirales (Lentivirus) ocurre frecuentemente en la vecindad de los genes expresados, la integración en regiones intergénicas, especialmente a distancias de más de 100 kpb de cualquier gen conocido (I) afectando muy poco la transcripción de estos genes. Vectores derivados de MLV parecen tener preferencia para integrarse cerca del inicio de la transcripción (II), región que altera la expresión de genes endógenos adyacentes. Los vectores de Lentivirus parecen insertarse con mayor frecuencia dentro del gen (III), región que al parecer afecta poco a la regulación genética pero que tiene la mayor potencialidad de causar disrupciones en la transcripción del gen endógeno (Tomado de von Kalle et al, The Journal of Clinical Investigation, 2004).

zación. Son vectores con una alta capacidad infectante, no importando si la célula se encuentra en activa división o no. Sin embargo, dentro de sus desventajas podemos mencionar su alta inmunogenicidad y un efecto de corta duración, ya que no tienen la capacidad de insertarse en el ADN de la célula huésped, lo que determina que en tratamientos sucesivos puedan producirse altos títulos de anticuerpos por parte del paciente, derivando en un fracaso terapéutico.

Otros posibles vectores adenovirales incluyen los adenovirus con modificaciones en su capacidad inmunogénica y adenovirus asociados, que tienen limitada integración al genoma del huésped. Estos tipos de vectores se encuentran actualmente en fase de investigación. Los adenovirus asociados tienen la capacidad de insertarse en una secuencia específica en el cromosoma 9, sin alterar funciones génicas importantes como lo que podría ocurrir con los retrovirus; sin embargo, sólo pueden transportar se-

cuencias génicas cortas.

Otra estrategia utilizada para incorporar genes en los pacientes es la estrategia *ex vivo* (Figura 3), la cual consiste en extraer células de los pacientes, como por ejemplo células troncales de la médula ósea, de la sangre o de mioblastos y tratarlas con el vector, modificándolas genéticamente *in vitro*, para luego transplantarlas nuevamente en el paciente. Estas células deben tener las siguientes características: deben ser de fácil acceso, deben ser capaces de sobrevivir largos periodos de tiempo *in vivo* y, lo más importante, deben ser capaces de expresar un transgen en altos niveles por un largo periodo, además de no generar respuesta inmune en el hospedero. Las ventajas de usar la estrategia *ex vivo* incluyen la habilidad para caracterizar completamente la población de células modificadas antes del trasplante, la capacidad para subclonar células y producir poblaciones monoclonales que produzcan altos niveles de la proteína terapéutica así como también

analizar la población de células que presenten virus recombinantes, eventos de transformación u otras alteraciones no deseadas. Por lo tanto, se pueden utilizar vectores de baja eficiencia como plasmidios con ADN desnudos o liposomas, ya que las células que expresen el transgen pueden ser seleccionadas antes del trasplante generando clones estables, con alta eficiencia y baja mortalidad celular. Otra ventaja importante de mencionar, es que estas células generalmente no inducen reacciones inmunológicas en el huésped, como por ejemplo, las células mesenquimales. En estudios realizados en pacientes que sufren osteogénesis imperfecta, se ha logrado reparar con éxito el tejido óseo mediante la administración de células mesenquimales infectadas con un vector adenoviral, el que a su vez contiene una mutante del gen que codifica para colágeno tipo I.

## APLICACIONES DE LA TERAPIA GENICA

### Terapia génica contra el cáncer:

Actualmente, la segunda causa de muerte en los Estados Unidos de Norte América es el cáncer, con aproximadamente medio millón de muertes y un millón de casos diagnosticados anualmente, lo que justifica que hoy en día la mitad de la investigación en terapia génica esté destinada al estudio del cáncer. Los métodos convencionales utilizados en la actualidad para el tratamiento del cáncer incluyen la radioterapia, quimioterapia y la remoción quirúrgica. Indudablemente, cuando estas técnicas son utilizadas en las etapas iniciales de la enfermedad, tienen mayor éxito; sin embargo, poseen efectos graves e

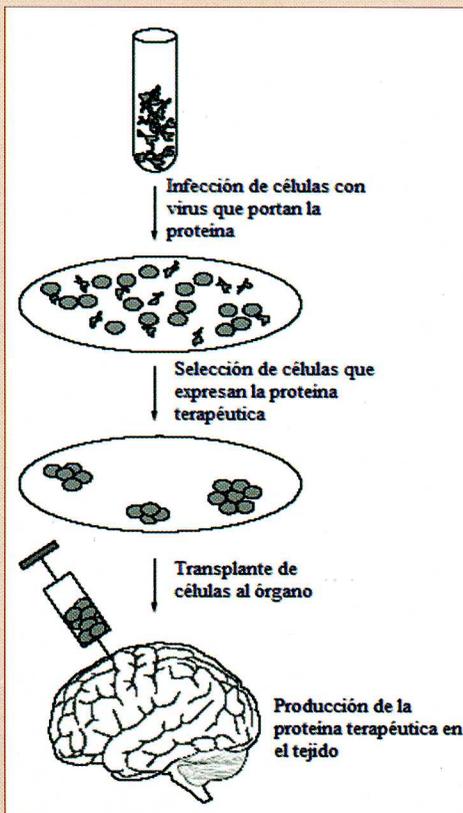


Figura 3.

Transferencia de genes ex vivo. Esta estrategia se basa en la utilización de células las cuales son infectadas con el virus in vitro. Las células son posteriormente transferidas al individuo o al tejido blanco, donde se expresará el gen terapéutico (Tomado de Selkirk, S.M.; Postgrad Med J, 2004).

indeseados en los pacientes. La terapia génica es considerada entonces, una posibilidad de terapia complementaria a las mencionadas en el tratamiento de esta grave enfermedad y que esta enfocada principalmente a restaurar la expresión de genes supresores de tumor, inactivar la expresión de oncogenes, distribuir genes que sensibilicen a las células malignas frente a los fármacos y a la marcación de células cancerígenas para otorgarles capacidad inmunogénica.

Algunos de los mecanismos descritos como estrategias para anular la expresión de un gen, se encuentra la utilización de nucleótidos antisentido y, más recientemente, el ARN de interferencia (siRNA).

La terapia con nucleótidos antisentido consiste en la introducción de oligonucleótidos de secuencia corta, complementaria a una región específica del ARN mensajero (ARNm) para la proteína blanco. Estos oligonucleótidos se unen por complementariedad al ARN mensajero, promoviendo su degradación por enzimas específicas y, por lo tanto, impidiendo la traducción de la proteína. Los oligonucleótidos antisentido necesitan una modificación química que puede consistir en la introducción de grupos sulfidrilos, para evitar su degradación por parte de enzimas en la célula huésped. Estos nucleótidos son introducidos a la célula dentro de liposomas, pero su expresión transiente hace que los efectos no sean permanentes en el tiempo. Hasta el momento, en estudio preclínicos, su efecto se observa cuando son administrados en altas concentraciones, pero no poseen especificidad por el tipo celular, por lo tanto, actúan tanto en células transformadas y no transformadas pudiendo generar

efectos secundarios no deseados. Existe actualmente solamente una compañía que ha tenido éxito en obtener la licencia para una terapia antisentido a través del producto Vitravene® para el tratamiento de la retinitis causada por citomegalovirus en pacientes HIV positivos.

El ARN de interferencia o silenciadores de genes post transcripcional, consiste en un ARN corto, de doble hebra, que al ingresar a la célula se asocia a un complejo enzimático de

nominado RISC (RNA Induce Silence Complex), el cual utiliza una de las hebras del ARN de interferencia para, por complementariedad, reconocer el ARN mensajero blanco a silenciar, lo corta y posteriormente las RNAsas endógenas degradan el ARN fragmentado, previniendo la traducción a una proteína activa. Esta técnica tiene aplicaciones en varias enfermedades, incluyendo la infección por el HIV, induciendo la supresión de proteínas virales específicas que podría prevenir la replicación y la propagación viral. Esta técnica también puede suprimir la expresión de productos de genes aberrantes o proteínas inflamatorias que pueden contribuir a los distintos estados de la enfermedad.

En la actualidad se están investigando diversas propuestas terapéuticas; hay pruebas excelentes a partir de modelos animales pero, la experiencia con antineoplásicos convencionales, ponen en alerta la sobre la extrapolación a la situación clínica. Al mismo tiempo, muchas terapias derivadas de esta tecnología se encuentran en investigación en estudios clínicos fase III.

## **PERSPECTIVAS DE LA TERAPIA GÉNICA EN LA MEDICINA VETERINARIA.**

La terapéutica en medicina veterinaria ha evolucionado notablemente en los últimos años, permitiendo que los animales, sobre todo los de compañía, estén junto a sus dueños por un periodo más prolongado. Sin embargo, esto ha contribuido a que nuestros animales manifiesten un mayor porcentaje de enfermedades propias de la senescencia como es el cáncer, para las cuales se aplican terapias similares a las ya desarrolladas para pacientes humanos, como son la quimioterapia y el abordaje quirúrgico. En la mayoría de los casos, el mecanismo por el

cual se desencadenan estas enfermedades, es similar en humanos y animales con sólo algunos casos particulares con etiología diferente.

Actualmente la terapia génica esta exclusivamente orientada al tratamiento de enfermedades humanas, habiéndose aprobado el primer ensayo clínico en 1988 en Estados Unidos y posteriormente se realizaron 3000 tratamientos. Sin embargo, esta terapia lleva consigo un riesgo relacionado principalmente con la presentación de inflamación o infecciones activas luego de la administración de un vector viral, eventos de recombinación múltiple o la transformación maligna de células como consecuencia de la inserción aleatoria en el genoma de los vectores retrovirales. Esto último ocurrió en 2 pacientes tratados con trasplantes autólogos de células troncales infectadas con un retrovirus, quienes desarrollaron leucemia debido a que el virus se integró en una región cercana de un oncogen, resultando en su sobreexpresión. Por el contrario, 11 pacientes que sufrían la misma enfermedad y que recibieron el mismo tratamiento, aliviaron completamente los síntomas.

Los avances logrados en la investigación para el desarrollo de la terapia génica indican que, pese a la variedad de enfermedades que es posible tratar y las diferentes técnicas disponibles para ello, en medicina humana, a la fecha no han logrado solucionar los problemas atinentes a la seguridad y a la eficiencia de este tipo de terapia. Sin embargo, estos mismos avances dan pie para que en el futuro, esta tecnología pueda ser desarrollada en la medicina veterinaria, entregando una alternativa de tratamiento complementaria a la ya existente que cure completamente estas enfermedades.

## **Bibliografía**

- Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J.Cell.Mol.Med.* 3:301-316
- Selkirk, S.M. 2004. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J.* 80:560-570
- Von Kalle, C., Baum, C., Williams, D. Lenti in red: progress in gene therapy for human hemoglobinopathies. 2004 *J. Clin. Invest.* 114: 889-891.

Dr. Rodolfo Paredes E. (M.V.)  
Laboratorio de Biología Molecular  
Programa de Biología Celular, ICBM  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile.

Dra. Lisette Lapierre A. (M.V.)  
Laboratorio de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile.

Dr. Leonardo Sáenz I. (M.V.)  
Laboratorio de Terapia Génica  
y Transducción de Señales  
Programa de Farmacología  
Molecular y Clínica, ICBM  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile.

Dra. Daniela Iragüen C. (M.V.)  
Laboratorio de  
Farmacología Veterinaria  
Facultad de Ciencias  
Veterinarias y Pecuarias  
Universidad de Chile.