

Acta Médica

Grupo Ángeles

Volumen
Volume **2**

Número
Number **2**

Abril-Junio
April-June **2004**

Artículo:

Cáncer iatrogénico: Obstáculos y
posibilidades en terapia génica

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Grupo Ángeles Servicios de Salud

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com



Cáncer iatrogénico: Obstáculos y posibilidades en terapia génica

Mario Castañeda*

La relación virus-hospedero ha sido explorada en sentidos opuestos en la comunidad biomédica desde el siglo pasado. El virus como agente causal de enfermedades y también, contraintuitivamente, como agente curativo. En investigación básica, el reconocimiento de la naturaleza particulada del virus y de su proliferación en pasos bien definidos, con el modelo bacteria-bacteriófago, dio origen a la disciplina de biología molecular. Félix d'Herelle, quien en pláticas con Albert Einstein empezó a desarrollar esos conceptos, propuso desde hace ya unos 80 años que estos bacteriófagos líticos (por lisis de la bacteria infectada) podrían ser usados en el control de la enfermedad cólera y, por consiguiente, constituirse en "principios de salud".¹ En enero del 2004, un grupo en Quebec (Phage-Tech, Inc.) ha solicitado una patente para cubrir una serie de procedimientos que identifican blancos bacterianos con el uso de polipéptidos provenientes de varios fagos. Las concentraciones mínimas inhibitorias de compuestos de bajo peso molecular probados sobre blancos así identificados en pseudomonas, estreptococos y estafilocos son prometedoras, además de ser inocuas para células mamíferas. El gran atractivo que los virus ejercen se debe a su ingeniosa capacidad (además de la de infección) de seducir los mecanismos más íntimos de sobrevivencia y reproducción celular, como información génica y síntesis de proteínas, para beneficio propio y así poder producir una nueva población viral. Los hay de dos tipos: a) los que permanecen dentro de la célula, ya sea integrándose al ADN cromosomal de la célula hospedera o quedando en ella como episomas (elementos de ADN que residen en

el núcleo celular pero independientes del ADN cromosomal), y b) los que destruyen, lisan a la célula. Todos ellos son útiles en medicina. Es decir, en aquellas enfermedades donde la modificación a nivel génico de funciones celulares específicas sea eficaz. El problema, como en toda intervención médica, es la eficiencia y el posible daño de dicha intervención. Demasiado poco veneno (virus en latín) y resultados negativos; exceso y resultados catastróficos. Además, los llamados efectos colaterales, no deseados, o adversos o simplemente las consecuencias inesperadas cuando se trabaja en las fronteras del conocimiento. En el caso de los primeros, el médico está ya (y debe estar) consciente con el uso de cualquier medicación. Los dos primeros problemas son explorados en los estudios preclínicos. El tercero desgraciadamente aparece hasta la realización de los estudios clínicos. Y en terapia génica, la muerte en 1999 de un adolescente (J.G.) en la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia por reacción inflamatoria con el uso de un vector adenoviral y recientemente la producción de cáncer en dos niños en el Hospital Infantil Necker de París por un vector retroviral. El problema con el primer caso, aunque dramático, es aparentemente de más rápida solución. El de los segundos casos parece ser más instructivo y a él me referiré en esta ocasión.

La terapia génica utiliza a los virus como agentes de transferencia de genes a células eucariotas y de aquí el término de vector. Existen ciertos requerimientos para el uso de un vector: debe ser seguro, eficiente, capaz de permitir la expresión del gen terapéutico en niveles y por tiempo adecuados, de manejar una variedad de esos genes y de mostrar una relación de dosis-respuesta. Varios tipos de virus pueden ser usados: retrovirus, lentivirus (como el VIH, virus de la inmunodeficiencia humana y que ha modificado la clasificación de éstos ahora como una subclase de los retrovirus), adenovirus, virus adenovectores, herpes simplex tipo 1 y el de la vacuna. Hasta ahora los vectores más usados son los provenientes de los retrovirus. Estos virus poseen una envoltura proteica y un genoma constituido de ARN de hilo sencillo de unas 10 kb (kilobases) que permite colocar insertos de 2-6 kb.

* Anterior Investigador Titular "C". Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:
Mario Castañeda
Fuente Murmullos 87-101. Lomas Palmas 52788 Huixquilucan, Estado de México. Correo electrónico: marjorcast@cts.com

Aceptado: 18-03-2004.

Contienen sólo 3 genes (los lentivirus poseen 9): *gag* (proteínas centrales), *pol* (polimerasa reversa que copia al ARN original en ADN de doble hilo a su vez insertado en el ADN hospedero) y *env* (proteínas de la envoltura). Estos genes son reemplazados por los terapéuticos. En cada extremo, el genoma posee además una secuencia repetida de unas 0.6-0.8 kb llamada LTR (long terminal repeat) fundamental para su integración en el ADN hospedero y que sirve como promotor (secuencia nucleotídica con función reguladora y donde se unen las polimerasas) tanto de la síntesis de ADN como de su transcripción en ARN. Los genes terapéuticos son puestos bajo ese promotor (o de otro de origen mamífero). La reversión a la forma patógena de estos vectores es prácticamente nula puesto que desde 1989 no se ha observado un solo caso de replicación viral en más de unos 100 ensayos clínicos.

Los blancos de estos vectores pueden ser células somáticas mamíferas que a su vez servirán como clonas expansoras de poblaciones genéticamente modificadas. El mejor candidato celular es el de las células progenitoras. De éstas, las más estudiadas son las hematopoyéticas (HSC's, hematopoietic stem cells). Su utilización en enfermedades monogénicas que afectan la producción de células sanguíneas ha sido por demás obvia y ventajosa en relación al injerto de médula ósea parcialmente compatible. La mayoría de las HSC's se encuentran en interfase y los vectores retrovirales sólo se integran en células en división. El uso de citocinas estimuladoras de su proliferación y su subsecuente purificación del resto de células, ha permitido su transducción eficiente *ex vivo* para ser reintroducidas autólogamente al paciente original. El virus Moloney de la leucemia murina (Mo-MLV, Moloney murine leukemia virus) puede infectar tanto células de ratón como humanas (anfítrico). Esta anfitropía permite el paso, más o menos directo, del trabajo en el laboratorio hacia el trabajo clínico y ha sido extensamente usado como vector. En particular, en niños con deficiencia inmune severa y combinada (SCID, severe combined immune deficiency). Ésta es un grupo de enfermedades genéticas causadas por mutaciones en varios genes involucrados en el desarrollo y en la función del sistema inmune tales como: γc (cadena gamma de los receptores a interleucinas 2, 4, 7, 9, 15 y 21, en general, mitógenos de leucocitos B y T, e inducidores de otras proteínas en estas células; en posición cromosomal Xq13), ADA (adenosina desaminasa con funciones en el metabolismo de purinas al hidrolisar adenosina hacia inosina; en posición 20q12-q13.11) y JAK3 (tirosina cinasa Janus 3 transductora de señales en membrana hacia citoplasma y núcleo, expresada sólo en células NK estimulando proliferación de células T; en 19p13.1). Mutaciones en el gen γc causan SCID ligada al cromosoma X (SCID-X1) y es la SCID más común (uno en 80,000 naci-

dos vivos). Las HSC's producen los progenitores CLP (common lymphoid progenitor) y CMP (common myeloid progenitor). CMP da lugar a granulocitos, monocitos, plaquetas y eritrocitos. CLP a células B (linfocitos dependientes de médula ósea y precursores de células plasmáticas), T (dependientes de timo con funciones en inmunidad celular) y NK (natural-killer cells, con actividad hacia el complejo de histocompatibilidad mayor). El camino hacia la producción de estas 3 últimas células se bloquea en SCID-X1 con el consecuente desarrollo de la inmunodeficiencia y muerte infantil por infecciones severas. La mayoría de estos niños carecen de un donador de médula ósea HLA compatible (sobrevivencia de un 90% cuando de un hermano). Los trasplantes de padres o de personas menos relacionadas producen sobrevivencias en un 50-70%.

Ante estos últimos pobres porcentajes, los resultados con terapia génica son excelentes y han marcado un avance fundamental en terapia génica. La primera SCID curada fue la ADA-SCID en el Hospital Infantil de Los Ángeles.² El grupo francés ha tratado a once niños con SCID-X con sólo un resultado negativo por falta de colonización de las células transplantadas.³ En el Instituto de Terapia Génica San Raffaele de Milán se han tratado exitosamente dos niños con ADA-SCID.⁴ La reconstitución inmune aparece en tiempos semejantes a los obtenidos por injertos de médula ósea de hermanos (2-3 meses contra 6 en injertos parcialmente compatibles). Este sol resplandeciente se ha visto ensombrecido sin embargo por el reporte del grupo francés de la aparición de leucemia en dos de sus pacientes.⁵ Unos tres años después de haber terminado la terapia y en un examen de seguimiento, se encontró leucocitosis con proliferación clonal de células T, esplenomegalia e infiltración de médula ósea. El vector retroviral se encontró integrado en el primer intrón del gen *LMO2* (proto-oncogen que codifica un dominio coordinado por zinc y rico en cisteína e histidina que sirve de mediador en interacciones proteína-proteína en algunos factores de transcripción y llamado LIM) en un caso. En el otro, la integración ocurrió cerca de este gen (unas 5 kb) hacia su izquierda. En muestras de sangre previamente colectadas, la clona original de células T pudo ser detectada desde un año después de la terapia; en un paciente se encontró una translocación t(6;13) y en el otro trisomía del cromosoma 11. *LMO2* (LIM domain only 2) está muy conservado en filogenia con un papel crucial en el desarrollo hematopoyético; su sitio de inicio de transcripción se localiza unas 25 kb hacia la derecha de un centro de translocación en 11p13 (11p13 ttc, T-cell translocation cluster) donde ocurren translocaciones (con el 13 y el 14) específicas de leucemias linfoblásticas agudas de células T. Su expresión en ratones transgénicos produce leucemias de células T. Se expresa normalmente en progenitores hematopoyéticos pero no en células post-tímicas. Estos da-

tos y la larga latencia en la presentación del cáncer son consistentes con los modelos cancerígenos de multietapas donde las mutaciones originales (activación de *LMO2* en estos dos casos) en células progenitoras, insuficientes *per se*, aumentan proliferación selectiva y la acumulación de mutaciones secundarias.

¿Cómo es posible que en estos dos casos, independientes entre sí, se haya activado el mismo proto-oncogen? Los humanos contamos con unos 3 mil millones de pares de bases en nuestro genoma nuclear. La gran mayoría de ellas están fuera de genes activos. Tenemos enormes familias de pseudogenes (genes inactivos). Por ejemplo y de interés en nuestras capacidades, los genes que codifican para los receptores al olor constituyen la familia más grande en los mamíferos. Un 20% son pseudogenes en el ratón, un 30% en el chimpancé y en el gorila y un 60% en el humano (con capacidad para los aproximadamente mil diferentes receptores con los cuales contamos en el 40% restante). Entre paréntesis, esta mayor pérdida está relacionada a nuestra adquisición de visión tricromática (tres opsinas, pigmentos, sensibles a diferentes longitudes de onda y dos codificadas en el cromosoma X). ¡Entre mejor vemos peor nuestro olfato! Mas regresando, espacio hay más que suficiente. El grupo retroviridae es oncogénico en aves y en mamíferos. Los MLVs están asociados con cánceres hematológicos. Su producción puede ser inducida por un oncogen contenido en el virus o por la integración (y subsecuente activación) en un proto-oncogen celular. El primer mecanismo está descartado en estos dos casos por la misma construcción del vector. Sin embargo, todos estos vectores contienen el promotor (además de un "enhancer" o intensificador) de los LTRs en los extremos 5' y 3'. Los nuevos vectores podrán carecer de la región U3 que contiene dichos intensificador y promotor y ser adicionados de otro promotor específico de otra línea celular. El segundo, llamado mutagénesis insercional, es el más interesante; aunque unos 250 pacientes (de otras patologías) con transferencia génica retroviral a HSC's continúan sin cáncer (datos del subcomité especial de la American Society of Gene Therapy). ¿Existe entonces una selección en los sitios de integración? La inserción de retrovirus oncogénicos muestra preferencia por sitios en cromatina hipersensibles a hidrólisis por ADNasa 1 y los cuales contienen genes activamente transcritos. Un grupo de la sección de Tecnología Genómica del NIH acaba recientemente de apoyar esta preferencia. Unas 900 integraciones del MLV fueron localizadas en el mapa del genoma humano. Un 34% ocurrieron en genes. ¿Fueron estos sitios tomados al azar? De unas 10,000 integraciones al azar simuladas por computación, sólo un 22% cayeron en genes ($P < 0.0001$). De las 900 integraciones reales, un 20 y un 17% ocurrieron dentro de 5 kb del

sitio de iniciación de transcripción y dentro de 1 kb de regiones ricas en dinucleótidos CpG, respectivamente. Estas "islas" de CpG están fuertemente asociadas a los sitios de iniciación de la transcripción en genomas de vertebrados. Los valores en la simulación fueron de 4 y 2% respectivamente. En las integraciones génicas se mostró también una preferencia por los genes más activamente transcritos. Aunque no se encontraron genes preferenciales, con los 5 millones de células CD34 (glicoproteína de unos 110 kD selectivamente expresada en las células hematopoyéticas progenitoras) transformadas por el vector retroviral e inyectadas en cada niño y teniendo en cuenta unos 18,200 genes conocidos, se puede obtener un promedio de 55 integraciones en el gen *LMO2* por tratamiento.⁶ Por último, el gen terapéutico. El gen *γc* no se ha considerado problemático porque se expresa normalmente en células linfoides y hematopoyéticas. A pesar de ello, codifica una subunidad de receptores a citocinas. La sobreexpresión de IL-7 (requerida en el desarrollo y sobrevida de células B y T; en 8q12-q13), -9 (estimula proliferación e inhibe apoptosis de células hematopoyéticas; en 5q31.1) y -15 (regula actividad y proliferación de T y NK, activa JAKs e intensificadores de transcripción, y aumenta la expresión de inhibidores de apoptosis; en 4q.31) produce linfomas de células B y leucemias linfocíticas T-NK. Es más, IL-7 disminuye la expresión del supresor tumoral *p27* y está elevada en pacientes con SCID-X1. El gen *p27* codifica un inhibidor de la cinasa ciclin-dependiente E-CDK2 controlando así, en G1, la progresión del ciclo celular; su degradación permite la transición de interfase hacia proliferación. Los aumentos en IL-7 y de la expresión de *LMO2* bien pudieran explicar el desencadenamiento de leucemia en estos dos pacientes. La comunidad internacional, a nivel tanto de laboratorios en tecnología de vectores como de organizaciones reguladoras, por ejemplo la FDA y la RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) en los EUA (y otros sitios en Europa), han apreciado este problema y se están tomando medidas para solucionar o por lo menos disminuir este tipo de complicaciones. Enfermedades linfoproliferativas también son desencadenadas en pacientes por tratamiento recibido en el trasplante de órganos aunque por mecanismos distintos obviamente.

El interés humano es perseverante e incursiones en terapia génica continúan y continuarán. En agosto 8, 2003 (*Science*) se reportó, en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la prolongación de la vida y el retardo de la progresión de la enfermedad, aún en las etapas de sintomatología evidente. ALS es progresiva y fatal por degeneración de las neuronas motoras de la médula espinal y del tallo cerebral. La forma familiar (rara) está asociada a mutaciones de la

dismutasa de superóxido dependiente de Cu-Zn y en quimeras celulares experimentales las células con esas mutaciones son protegidas por células adyacentes normales, y viceversa también. Bien, la inyección intramuscular de un vector viral adeno-asociado (AAV, adeno-associated viruses, parvovirus no patogénicos que dependen de otro virus "ayudador" para su replicación, con sólo 2 genes, de un sólo hilo de ADN y que raramente se integran) contenido el factor neurotrófico "insulin-like growth factor 1" (IGF-1) permitió su transporte retrógrado hacia el cuerpo de las neuronas motores. Planes para ensayos clínicos con enfermos de ALS están en desarrollo. En agosto 18, 2003 se realizó el primer tratamiento genético de Parkinson. Unos 3,500 millones de partículas del vector AAV con el gen de la enzima glutámico descarboxilasa (requerida para la producción del neurotransmisor inhibitorio GABA) fueron colocadas en el núcleo subtalámico de un paciente (el primero de doce) con Parkinson predominantemente unilateral. Este núcleo y el segmento interno del globo pálido se encuentran desinhibidos por la falta de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. En el raro evento de integración viral y activación de oncogenes, la respuesta neuronal no es de replicación sino de apoptosis; la pérdida neuronal en este sitio será de todas maneras benéfica en cuanto a sintomatología. Si este ensayo, en fase puramente I de seguridad en la actualidad, llegara a funcionar, el tratamiento genético resultante podrá fácilmente reemplazar al actual de estimulación cerebral profunda (DBS, deep brain stimulation) el cual es complejo, tiene un 30% de efectos adversos y es costoso. En el tratamiento de leucemia mieloide crónica donde el trasplante alógénico de células madre no es adecuado o es insuficiente, o se ha desarrollado resistencia a imatinib (Gleevec) existe la posibilidad de terapia genética al transferir y expresar el gen de un anticuerpo (contra la oncoproteína ABL, o BCR-ABL) intracitoplásmico ("intracuerpo") y producir apoptosis como ya se ha demostrado *in vitro*. Y en

el futuro, quizás cortar por lo sano y prescindir por completo del uso de los agentes virales e intentar la reparación *in situ* del gen afectado. Esto es posible al usar ADN de hilo sencillo, que no requiere de transferencia viral, y utilizar la maquinaria de reparación intracelular para cambiar, con ese nuevo templado correcto, las bases mutadas en el gen afectado. Así pues, el conocimiento científico y el tratamiento de enfermedades apoyado en ese conocimiento, aunque de manera penosa y desgraciadamente lenta para enfermos actuales, prosigue su marcha ineluctable. Y con ello, la medicina basada en ciencia (donde los principios de causalidad y determinismo son motores básicos), desde Galeno, Francis Bacon, René Descartes y otros en el desarrollo inicial del método científico y después en forma contundente en 1830 cuando Edward Jenner (en 1796 su primera inmunización en el hijo de su jardinero) inició los experimentos clínicos con la vacuna (la ciencia y la aplicación de la ciencia de Louis Pasteur), se establece de manera cada vez más firme dentro de las estrategias del tratamiento médico. Específicamente en este tipo de casos, la disciplina de medicina molecular.

REFERENCIAS

1. Castañeda M. *Antología de Biología Molecular*. 2a edición, México, DF: Dirección General de Publicaciones, UNAM; 1985: 41-58.
2. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, Lenarsky C et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995; 1: 1017-1023.
3. Hacein-Bey-Abina S, LeDeist F, Carlie F, Bouneaud C et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med* 2002; 346: 1185-1193.
4. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; 296: 2410-2413.
5. Hacein-Bey-Abina S, vonKalle C, Schmidt M, LeDeist F et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-256.
6. Wu X, Li Y, Crise B y Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 300: 1749-1751.

