



### III. HÍGADO Y RIÑÓN

## *La terapia génica: sus aportaciones a las enfermedades hepáticas y renales*

G. Mazzolini, J. Ruiz, C. Qian y J. Prieto

Unidad de Terapia Génica. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

#### INTRODUCCIÓN

La terapia génica representa una nueva y prometedora modalidad terapéutica aplicable a una diversidad de procesos patológicos. Básicamente consiste en la introducción de material genético en el interior de las células de un órgano o tejido con la intención de producir un efecto biológico de finalidad curativa<sup>1</sup>. La terapia génica se puede aplicar tanto a enfermedades genéticas hereditarias como a procesos adquiridos tal como el cáncer, las enfermedades infecciosas o los procesos degenerativos. La eficacia limitada de los vectores utilizados para transducir los órganos diana, la respuesta inmune que los vectores virales frecuentemente desencadenan en el huésped y la expresión transitoria del transgen son factores que continúan restando eficacia a esta modalidad terapéutica. Sin embargo hay que tener presente que aun con los vectores de expresión transitoria se logra inducir potentes efectos biológicos muy útiles para inducir respuestas inmunes o inhibir el crecimiento tumoral. La activa investigación en este campo y la aparición de vectores tóxicos, de expresión prolongada y regulable, abre perspectivas muy prometedoras a la terapia génica en prácticamente todos los campos de la patología humana.

En este artículo revisaremos los aspectos generales y el estado actual de la terapia génica especialmente en lo que se refiere a sus posibles aplicaciones en patología hepática y haremos una referencia a las posibilidades que ofrece esta modalidad terapéutica para el tratamiento de las enfermedades renales.

#### ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA TERAPIA GÉNICA

##### Material genético

El material genético que se emplea en terapia génica puede estar constituido por genes naturales, genes quiméricos o moléculas subgenómicas.

##### Genes naturales

Son secuencias de DNA que contienen los elementos necesarios para la síntesis de una proteína natural.

##### Genes quiméricos

Los genes quiméricos son genes de diseño, producidos en el laboratorio para la síntesis de una proteína no existente en la naturaleza. Son ejemplos de genes quiméricos los *anticuerpos de cadena simple*, o *intracelulares*, que son moléculas monocatenarias que reconocen al antígeno en el interior de la célula o las *proteínas dominantes mutadas*, que son similares a proteínas reguladoras que se unen a secuencias determinadas de DNA y que tras modificaciones en su estructura mantienen la capacidad de unión sin su efecto regulador.

Además de los genes, existen otros tipos de material genético que se pueden emplear para obtener un efecto biológico sin que se requiera la síntesis proteica. En éste apartado se encuentran:

a) las *ribozimas*, son moléculas de RNA que se unen específicamente a un RNA mensajero y catalizan una reacción que lo corta, inactivándolo; b) las *moléculas antisentido*, son secuencias de DNA de cadena simple o de RNA que reconocen de forma específica un determinado RNA mensajero, uniéndose a él y bloqueando su función<sup>2</sup>; c) y las *moléculas señuelo*, que son pequeños fragmentos de RNA que se unen de forma específica a proteínas con afinidad por ácidos nucleicos desplazando a los ligandos alternativos.

##### Vectores empleados en terapia génica

Existen dos categorías de vehículos o vectores capaces de llevar a cabo este objetivo: los llamados vectores no virales o físicos y los vectores virales<sup>3</sup>.

*Vectores no virales:* las principales ventajas de este tipo de vectores pueden resumirse en los siguientes puntos: a) son sencillos de preparar; siendo posible su producción a gran escala, b) puede incorporar DNA de gran tamaño, c) tienen baja toxicidad e inmunogenicidad, lo que posibilita su administración repetida, d) pueden manipularse de forma que tengan especificidad tisular. Su principal desventaja actual es la baja eficacia global de estos sistemas si se compara con la de los vectores virales. Entre los vectores no virales se encuentran liposomas, el sistema de bombardeo de partículas mediante la pistola génica, el DNA desnudo («naked DNA») o los complejos DNA-proteínas.

Los *liposomas* son el sistema más popular de transferencia de genes *in vitro* y constituyen una vía alternativa para incorporar DNA al hígado. La eficacia de transducción en este órgano es críticamente dependiente del tamaño del liposoma, de forma que solamente en el caso de aquellos menores de 100 nanómetros se consigue evitar su atrapamiento por las células de Kupffer y alcanzar los hepatocitos<sup>4</sup>. Además del tamaño se pueden modificar otras características de los liposomas, como es el caso de los inmunoliposomas en los que se incorporan anticuerpos monoclonales que les permiten dirigirse a células concretas o de los virosomas, que incluyen proteínas o péptidos endosomolíticos (como la hemaglutinina del virus Influenzae) que bloquean la degradación lisosomal del DNA aumentando la cantidad de este que puede alcanzar el núcleo celular. Por otra parte pueden añadirse en superficie ligandos de receptores específicos de algún subtipo celular como es el caso del receptor hepatocitario de asialoglicoproteína.

El *bombardeo de partículas* o método balístico consiste en la aceleración mediante gas presurizado de micropartículas de oro o tungsteno que tienen adheridas a su superficie moléculas de DNA o RNA para introducir las en el interior de las células<sup>5</sup>. La experiencia del empleo de esta técnica a nivel hepático es muy escasa.

*Complejos DNA-proteína:* la existencia en los hepatocitos de receptores de membrana específicos lo convierte en un órgano ideal para la captación de moléculas de DNA a través de su asociación con el ligando de esos receptores. Wu y cols. fueron los primeros en emplear complejos con residuos de asialoglicoproteína para la transferencia de genes a los hepatocitos *in vivo*<sup>6</sup>. Una estrategia similar ha sido empleada utilizando el receptor de la transferrina. El paso limitante en todos aquellos casos en los que se emplean complejos DNA-proteína es la internalización de los mismos en vesículas de endocitosis que se funden con lisosomas y terminan por degradar el DNA.

*DNA desnudo:* la administración directa de DNA plasmídico puede transducir con eficacia limitada células de músculo, piel o hígado<sup>7</sup>. Experimentos iniciales demostraron que el DNA es captado eficientemente por las células pero es degradado hasta resultar indetectable después de las primeras 48 horas. La inyección de DNA desnudo en el músculo es útil para inducir respuestas inmunes frente al antígeno codificado por la secuencia de DNA empleada.

*Vectores virales:* constituyen la forma más eficiente de transferir genes terapéuticos al interior celular y se utilizan en la actualidad con mayor frecuencia que los no virales.

Los vectores virales se generan eliminando uno o más genes indispensables para la replicación del virus, e incluyendo el gen (o los genes) terapéutico(s). De esta forma el nuevo virus es defectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar las células pero es incapaz de multiplicarse en ellas. Entre los virus utilizados en los estudios clínicos o pre-clínicos se encuentran los retrovirus, los adenovirus, los virus adenoasociados y los virus herpes, lentivirus y virus SV40. La falta de especificidad tisular y la respuesta inmune desencadenada en el huésped son dos de los principales inconvenientes del uso de algunos de los vectores virales. En cuanto a la transferencia de genes al hígado y a las células tubulares renales de los adenovirus han sido los más ampliamente empleados tanto *in vivo* como *in vitro*.

*Retrovirus:* son virus RNA murinos de cadena simple. Para que los retrovirus sean eficaces transduciendo una célula e integrando el material genético en su genoma, la célula diana debe poseer un receptor para el retrovirus y estar en división<sup>8</sup>. Los hepatocitos y células tubulares renales son células habitualmente quiescentes y ello junto a los bajos títulos obtenidos durante la producción de retrovirus (cerca de  $10^6$  partículas infecciosas por ml), supone una importante limitación para el uso de estos vectores para la transducción del hígado o riñón *in vivo*. El cultivo *in vitro* de hepatocitos permite su transducción del hígado o riñón *in vivo*. El cultivo *in vitro* de hepatocitos permite su transducción *ex vivo* por vectores retrovirales lo que hace posible la transferencia de genes terapéuticos utilizando este tipo de vectores. De esta forma se ha conseguido en modelos animales la corrección parcial de la tirosinemia tipo I, de la hipercolesterolemia familiar y del déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina. El desarrollo reciente de *lentivirus* como vectores de terapia génica constituye una alternativa prometedora para la transferencia génica *in vivo* a células que no se encuentren en división como los hepatocitos o las células tubula-

res renales ya que la característica más importante de estos virus es su capacidad de infectar células tanto en división como en estado quiescente<sup>9</sup>.

*Adenovirus*: son virus DNA de cadena doble que pueden infectar células epiteliales en reposo. Los vectores adenovirales de primera generación se construyen mediante la delección de los genes de la región E1 y E3 lo que los transforma en virus defectivos, incapaces de replicarse. Contrariamente a los retrovirus, los adenovirus no integran su material genético en el genoma celular siendo su expresión transitoria<sup>10</sup>. Los adenovirus de 1.<sup>a</sup> generación inducen respuestas inmunes humorales y celulares en los animales a los que se administra. La respuesta humoral impide la segunda administración eficaz del vector y la inmunidad celular ocasiona la eliminación de las células trasducidas, el cual habitualmente no excede de dos semanas. Por ello aunque diversas publicaciones han descrito en varios modelos animales la corrección parcial o completa de procesos como la hemofilia, deficiencias en la conjugación de la bilirrubina, tirosinemia tipo I y III y el déficit del receptor de LDL utilizando vectores adenovirales de 1.<sup>a</sup> generación, la eficacia de la transferencia génica es limitada en el tiempo. Recientemente se han desarrollado vectores adenovirales en los que todo el material genético del virus ha sido eliminado exceptuando las señales de empaquetamiento terminales. Estos adenovirus denominados «gutless» permiten una expresión muy prolongada del transgen en hígado que perdura a niveles elevados hasta 10 meses después de la administración intravenosa del vector<sup>11</sup>. Junto a la larga expresión de los adenovirus gutless no inducen respuesta inmune celular y su administración no va seguida de efectos tóxicos. Este tipo de vectores ha abierto grandes esperanzas a la terapia génica de procesos que exigen expresiones largas del transgen y además la alta capacidad de los gutless (también llamados «high capacity adenovirus») permite la introducción de varios transgenes y de sistemas de regulación por fármacos de la expresión de los genes contenidos en el vector.

*Virus adenoasociados (AAV)*: Estos parvovirus no son patogénicos para el hombre y poseen diversas ventajas como vectores de terapia génica, entre ellas figura el hecho de que no desencadenan respuesta inmune en el genoma del huésped con un cierto tropismo por un sitio específico del cromosoma 19 permitiendo una larga expresión del transgen<sup>12</sup>. Poseen además un cierto grado de tropismo por el hígado tras su administración sistémica y han sido empleados para transducir de forma prolongada los hígados de ratones con el Factor IX humano. Sin embargo el campo en el que han levantado mayores

expectativas es en la transferencia génica al músculo esquelético, donde la expresión es muy duradera y en donde pueden generar altos niveles de la proteína codificada por el transgen. Recientemente algunos estudios han mostrado que los agentes genotóxicos, como el ectopósido o las radiaciones gamma, pueden incrementar la eficiencia en la transducción *in vitro* de las células por el AAV. También se ha demostrado que la radiación gamma incrementa la transducción de hepatocitos y de tejido neuronal *in vivo*.

El *virus del herpes simple (HSV)* es un vector prometedor para la transferencia génica al sistema nervioso, pero ofrece también la posibilidad de lograr una eficaz transducción de los hepatocitos de ratón *in vivo*, como se ha observado en estudios de transferencia al hígado del gen del factor IX lo que permitió alcanzar niveles terapéuticos de este factor de coagulación en sangre<sup>13</sup>.

## APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y RENALES

### Enfermedades renales

Los vectores más utilizados para la transducción de las estructuras tisulares renales han sido los adenovirus y los virosomas. Entre los últimos se ha utilizado los liposomas HVJ, en donde el DNA plasmídico conteniendo el gen de interés es co-encapsulado con virus HVJ (un virus Sendai) inactivado y con una nucleoproteína en liposomas. El virus Sendai contiene una proteína fusogénica que facilita la transferencia del transgen al interior de la célula y la nucleoproteína permite un paso rápido del DNA al núcleo celular. Los virosomas inyectados a través de la arteria renal consiguen la transfección efectiva pero transitoria de un 15% de células glomerulares<sup>14,15</sup>. La administración de adenovirus por vía intrarterial logra transducir sólo escaso número de células tubulares renales<sup>15</sup>. La administración retrógrada en la pelvis renal es más eficiente que la inyección intra-arterial obteniéndose la transducción de abundantes células del epitelio tubular en médula<sup>15</sup>. En modelos animales de enfermedad poliquística se comprobó que la administración de adenovirus por arteria renal permitía transducir eficientemente la pared de los quistes. Este hallazgo sugiere que el adenovirus accede a la luz del quiste por una mayor permeabilidad de la barrera vascular renal en el riñón poliquístico que en el riñón normal<sup>15</sup>.

Se ha considerado la transferencia génica para el tratamiento de una diversidad de procesos que afectan al riñón incluyendo el riñón trasplantado, la en-

fermedad glomerular aguda, la enfermedad intersticial crónica y el cáncer renal. La terapia génica pueden contribuir a la tolerancia del injerto mediante la transducción *ex vivo* del órgano del donante con vectores conteniendo genes capaces de inhibir los linfocitos T reactivos frente a los antígenos de trasplante, tal como FasL o la proteína de fusión CTLA4-Ig. En el tratamiento de la enfermedad glomerular aguda se han utilizado desde la transferencia al músculo de decorina, una proteína que liga TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3, hasta secuencias antisentido frente al TGF- $\beta$ <sup>15</sup>. Esta modalidad terapéutica ha permitido reducir la lesión glomerular en un modelo en ratas de glomerulonefritis inducida por anti-Thy. La fibrosis glomerular e intersticial es el marco lesional de la insuficiencia renal crónica. Este cuadro es uno de los procesos más necesitados de nuevas opciones terapéuticas y por ello constituye una de las metas más importantes de la terapia génica aplicada a riñón. Para afrontar el tratamiento de estos cuadros es necesario mejorar en el diseño de vectores y técnicas que permitan una mejor transducción del parénquima renal, de los vasos renales y del glomérulo así como identificar los genes más eficaces en la neutralización de citoquinas pro-fibrogénicas como el TGF $\beta$ 1.

Posiblemente, y aunque parezca paradójico, una de las metas más asequibles para la terapia génica contando con los vectores y genes terapéuticos hoy disponibles es el cáncer renal. En el tratamiento de este proceso se pueden emplear una diversidad de procedimientos incluyendo la transferencia al tumor de genes suicidas (eg timidín quinasa), o genes de citoquinas estimuladoras de la respuesta inmune (eg IL-12), o combinación de éstas con quimiocinas específicas para linfocitos T activados (eg IP-10) o genes codificantes para factores antiangiogénicos. De todos estos sistemas terapéuticos del cáncer nos ocuparemos al hablar de la terapia génica de las enfermedades hepáticas.

### **Terapia génica de las enfermedades hepáticas**

La transferencia génica al hígado es de potencial interés en el tratamiento de una gran diversidad de procesos incluyendo las enfermedades metabólicas de base hereditaria, las hepatitis virales crónicas y la cirrosis y el cáncer primitivo y metastásico de hígado. Más arriba se ha mencionado el uso de distintos vectores en la corrección de defectos hereditarios caracterizados por deficiencia en genes expresados en hígado. Nos referiremos ahora a las posibles aplicaciones potenciales de la terapia génica en las hepatitis virales y de modo especial con-

sideraremos la terapia génica de los tumores hepáticos primitivos y metastásicos.

### **Hepatitis vírica**

Menos de 40% de los pacientes con hepatitis crónica B y menos del 30% de los que sufren hepatitis crónica C responden al tratamiento con interferón alfa (IFN). En estos últimos la combinación IFN más ribavirina no sube el porcentaje de respondedores por encima del 40%. Recientemente se ha observado que con dosis semanales de IFN pegilado (en lugar de la dosis 3 veces por semana con el interferón no pegilado) se alcanzan concentraciones séricas estables a lo largo de los 7 días. Esta farmacocinética, causante de una acción sostenida del interferón, se asocia a un aumento significativo en las tasas de respuesta. Con la introducción de vectores de terapia génica que permiten una expresión estable y regulada del transgen en el hígado se podrían transferir el gen del interferón al hígado convirtiendo a este órgano en factoría del fármaco. Con esta modalidad terapéutica se obtendrían niveles altos y sostenidos de interferón en hígado durante largos períodos de tiempo lo que junto a una mayor comodidad para el paciente (una sola administración del vector aseguraría tratamiento para varios meses) podría esperarse una mayor actividad antiviral. Una reciente publicación ha mostrado que la administración de un vector adenoviral con el gen del interferón es capaz de prevenir la hepatitis vírica en un modelo murino.

Además del interferón se pueden utilizar secuencias antisentido o ribozimas con el fin de inhibir la replicación viral. Si se utilizan vectores de expresión muy duradera los hepatocitos trasducidos adquirirán ventaja biológica al hacerse resistentes a la replicación viral y por ello mayor capacidad regenerativa siendo posible que, en el proceso de daño y reparación que caracteriza la hepatitis crónica, el hígado se repoblara preferencialmente por hepatocitos trasducidos. Es concebible, por tanto que no se precise la transducción del 100% de las células hepáticas para que las estrategias antisentido consigan el aclaramiento viral.

La terapia génica ofrece también la posibilidad de utilizar secuencias génicas del virus para inducir respuestas inmunes que pueden ser preventivas o curativas. La plasticidad de los procedimientos inmunoterápicos basados en transferencia génica hace posible inyectar las secuencias correspondientes a los antígenos virales junto con secuencias de citoquinas inmunomoduladoras potenciadoras de la respuesta inmune. Según los genes de citoquinas em-

pleados como adyuvante de las vacunas génicas se podría condicionar el tipo de respuesta inmune hacia un tipo humoral (Th2) o celular (Th1).

En nuestro grupo hemos construido un vector adenoviral conteniendo las secuencias correspondientes a nucleocápside (core) y envuelta (E1) del virus de la hepatitis C (AdCE1). La inyección de este vector a ratones fue seguida de una respuesta citotóxica frente a distintos epítopes de core y de E1<sup>16</sup>. La administración de AdCE1 junto con un adenovirus codificante para la IL-12 murina (AdIL-12) produjo una respuesta inmune celular tipo Th1 más potente que cuando se administraba solo AdCE1. La IL-12 es conocida como la citoquina más eficaz en el direccionamiento de la respuesta inmunológica hacia el tipo Th1.

Igualmente hemos comprobado que la administración por pistola génica de partículas de oro recubiertas de un plásmido que codifica la nucleocápside del virus de la hepatitis de la marmota induce respuestas tipo Th2 que no protegen frente a la inoculación posterior del virus, en tanto que la administración del mismo plásmido junto con otro codificante para la IL-12 de las marmotas provoca una potente respuesta inmune celular Th1 que protege eficazmente frente al inóculo viral. Hay sin duda un futuro para las vacunas génicas con finalidad preventiva o curativa en el campo de la hepatitis viral tanto B como C.

### Terapia génica de los tumores hepáticos

El hepatocarcinoma (HCC) continúa siendo uno de los más frecuentes y devastadores tumores que afectan al hombre. Cada año se diagnostican 250.000 nuevos casos de HCC y mueren alrededor de 1.000.000 pacientes en el mundo entero. En la mayoría de los casos el HCC aparece sobre un hígado cirrótico. El HCC continúa siendo una enfermedad de mal pronóstico con sólo un 3% de supervivencia a los 5 años<sup>17</sup>. El trasplante hepático, la resección quirúrgica y la crioblación son los tratamientos que ofrecen probabilidades curativas, pero son efectivos en la minoría de pacientes que presentan tumores pequeños y localizados<sup>17</sup>.

En la terapia génica del cáncer pueden utilizarse estrategias distintas basadas en transferencia de genes con acciones biológicas diversas. Las diversas modalidades terapéuticas se enuncian a continuación:

a) eliminación de las células tumorales mediante transferencia de genes que sensibilizan a las células transducidas frente a fármacos que no son tóxicos para el resto de las células del organismo (genes suicidas).

b) Potenciación de la respuesta inmune antitumoral (inmunoterapia génica) mediante la transferencia de genes de citoquinas, combinación citoquinas-quimioquinas, moléculas co-estimuladoras o terapia celular adoptiva con células modificadas *genéticamente ex vivo*.

c) Inhibición de la acción de oncogenes mediante secuencias antisentido o ribozimas.

d) Reestablecimiento de la actividad de genes supresores de tumores (antioncogenes).

e) Transferencia de genes con efecto antiangiogénico.

En esta breve revisión por razones de espacio nos ocuparemos de las dos primeras.

### Genes suicidas

Este sistema consiste en la transferencia de genes que codifican enzimas que convierten profármacos no tóxicos en compuestos letales para las células transducidas. El más utilizado es el gen de la timidina kinasa del virus herpes simple (HSV-TK) que convierte el ganciclovir en ganciclovir monofosfato, producto que posteriormente es convertido en la forma trifosfato por kinasas celulares. Este último es capaz de bloquear la síntesis de DNA e inhibir de forma directa la actividad de la DNA polimerasa. Una característica de los genes suicidas es el poseer efecto «bystander», es decir, la capacidad de destruir no sólo la célula en la que se expresa el gen sino también las células del entorno por la difusión del metabolito tóxico<sup>18</sup>.

Diversos estudios han demostrado la eficacia del sistema de la timidina kinasa aplicado al tratamiento del HCC<sup>19</sup>. Un problema importante que limita la utilización de este tipo de terapia es el daño que experimentan también los hepatocitos normales lo que puede acarrear hepatotoxicidad considerable<sup>20,21</sup>. Un medio de evitar el daño del tejido hepático no tumoral es realizar la inyección del vector intratumoralmente en lugar de usar una vía sistémica o bien recurrir al uso de promotores específicos de tumor como el promotor de la alfa-fetoproteína.

### Inmunoterapia génica

Se ha sugerido que la ineficacia de la respuesta inmune para eliminar las células tumorales no se debe tanto a la ausencia de antígenos tumorales como a la capacidad de los tumores para evadir o inhibir la respuesta inmune antitumoral. Entre las causas que explicarían esta falta de respuesta inmune se encuentran el procesamiento y presentación

ineficientes de los antígenos tumorales, la falta de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o la producción por el tumor de factores inmunosupresores como el TGF- $\beta$ <sup>22</sup> o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) lo que puede conducir a la anergia de células T con especificidad antitumoral.

La administración de citoquinas que participan en la regulación del sistema inmune, puede activar la respuesta inmunológica y romper la tolerancia del huésped frente a los antígenos tumorales. Son numerosas las citoquinas que se han empleado mediante transferencia génica para el tratamiento de tumores (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF). La IL-12 es una de las citoquinas con más potente acción antitumoral. La base de su efecto tumoricidad radica en la capacidad de activar células NK y linfocitos citotóxicos frente al tumor, en su acción inductora de moléculas de adhesión en el endotelio de los vasos tumorales lo que permite a los linfocitos citotóxicos acceder al tejido tumoral y, junto a lo anterior, en su marcada acción antiangiogénica. En un modelo singénico ortotópico de HCC en ratas Búfalo la administración intratumoral de adenovirus codificante para IL-12 (AdIL-12) causó una regresión completa del tumor en la mayoría de los animales tratados. Igualmente se comprobó que la inyección de este vector en un nódulo tumoral en animales que presentaban dos tumores hepáticos en lóbulos distintos causaba la regresión tanto del nódulo tratado como del distante no tratado. Esta acción a distancia se debe al potente efecto antiangiogénico de la IL-12 y a la capacidad de inducir respuestas inmunes mediadas por linfocitos CD8<sup>+</sup><sup>23</sup>. La administración por vía portal de AdIL-12 produjo también una marcada reducción de la carga tumoral en ratas con HCC multifocal inducido por dietil-nitrosamina y en modelos de cáncer de colon metastásico en hígado<sup>23</sup>. Aunque la eficacia antitumoral de la IL-12 es grande también es significativa su toxicidad que depende básicamente de la capacidad de IL-12 de inducir la producción de interferón gamma. En el modelo de cáncer de colon se comprobó que la administración conjunta de AdIL-12 y de un adenovirus codificante para la quimiocina IP-10 (AdIP-10), que tiene como efecto el atraer linfocitos activados, resulta en un marcado aumento de la respuesta inmune citotóxica frente al tumor y en una acción sinérgica de las dos sustancias que permite reducir la dosis de IL-12 y por tanto su toxicidad sin que disminuya el efecto antitumoral<sup>24</sup>. Hemos comprobado además que la infección *ex vivo* de células dendríticas (las células presentadoras de antígeno profesionales) con AdIL-12 y su posterior inoculación en el seno del nódulo neo-

plásico causa de modo muy eficiente la regresión de la lesión tumoral en modelos de cáncer de colon (melero). Esta estrategia permite conseguir erradicar tumores establecidos sin el riesgo de efectos sistémicos nocivos de la IL-12.

La transferencia génica al tumor de moléculas coestimuladoras como CD40L (capaz de activar a las células dendríticas intratumorales) pone en marcha una cascada de citoquinas y quimiocinas con el resultado final de la regresión del nódulo tumoral<sup>25</sup>. Al igual que con la combinación IL-12/IP-10, la terapia conjunta con CD40L y otras citoquinas o quimiocinas podría causar a potentes efectos sinérgicos frente al tumor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mulligan RC: The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-32, 1993.
2. Eguchi Y: Antisense RNA. *Annu Rev Biochem* 60: 631-652, 1991.
3. Verma IM: Gene therapy. *Sci Am* 263: 68-72, 81-4, 1990.
4. Spajer J, Van Galen M, Roerdink F: Intrahepatic distribution of small unilamellar liposomes as a function of liposomal lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 863: 224-230, 1986.
5. Tang DC, Devit M, Johnston SA: Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154, 1992.
6. Wu GY, Wu CH: Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262: 4429-32, 1987.
7. Wolff JA, Malone RW, Williams P y cols.: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1464-1468, 1990.
8. Miller AD, Miller DG, García JV, Lynch CM: Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217: 581-99, 1993.
9. Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-7, 1996.
10. Kovesdi I, Brough DE, Bruder JT, Wickham TJ: Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8: 583-9, 1997.
11. Schiedner GN, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S: Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18: 180-3, 1998.
12. Bartlett JS, Quattrocchi KB, Samulski RJ: The development of adeno-associated virus as a vector for cancer gene therapy. In: Sobol RE, Scanlon KJ (eds.). *The Internet Book of Gene Therapy*. Stamford: Appleton & Lange, 1995. p. 27-39. The development of adeno-associated virus as a vector for cancer gene therapy. In: Sobol RE, Scanlon KJ (eds.). In: Sobol RE, Scanlon KJ (eds.). *The Internet Book of Gene Therapy*. Stamford: Appleton & Lange. p. 27-39, 1995.
13. Miyahara A, Johnson PA, Elam RL, Dai Y, Witztum JL, Verma IM, Friedman T: Direct gene transfer to the liver with herpes virus simplex type 1 vectors: Transient production of physiologically relevant levels of circulating factor IX. *New Biol* 4: 238-246, 1992.

14. Isaka Y, Akagi Y, Kaneda Y, Imai E: The HVJ liposome method. *Exp Nephrol* 6: 144-7, 1998.
15. Keley V, Sukhatme V: Gene transfer in the kidney. *Am J Physiol* 45: F1-F9, 1999.
16. Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J: Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 25: 470-7, 1997.
17. Okuda K: Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 15: 948-63, 1992.
18. Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ: *In situ* use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 23: 31-35, 1996.
19. Kuriyama S, Nakatani T, Masui K, Sakamoto T, Tominaga K, Yoshikawa M, Fukui H, Ikenaka T, Tsujii T: Bystander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 22: 1838-46, 1995.
20. Qian C, Iodate M, Bilbao R y cols.: Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 8: 349-48, 1997.
21. Bustos M, Sangro B, Alzuguren P, Gil AG, Ruiz J, Beraza N, Qian C, García-Pardo A, Prieto J: Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am J Pathol* 157: 549-59, 2000.
22. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA Jr: Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166: 991-8, 1987.
23. Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J: Adenoviral IL-12 based gene therapy of orthotopic liver cancer in rats. *Hepatology* 2000 (en prensa).
24. Narvaiza I, Mazzolini G, Qian C, Barajas M, Melero I, Prieto J: Intratumoral coinjection of two adenoviruses one encoding the chemokine IP-10 and another encoding interleukin 12 results in marked antitumoral synergy. *Journal of Immunol* 164: 3112-3122, 2000.
25. Sun Y, Peng D, Lecanda J, Schmitz V, Barajas M, Qian C, Prieto J: *In vivo* gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther* 7: 1467-76, 2000.