

Aplicación de tratamiento génico a un modelo subcutáneo de cáncer de pulmón murino

Manuel Rodrigo Garzón^a, Iñigo Tirapu Fernández de la Cuesta^b, Ainhoa Arina Iraeta^b, Miguel Noel Centelles Llorente^b y Javier Zulueta Francés^a

^aServicio de Neumología. Clínica Universitaria de Navarra. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

^bDepartamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria de Navarra. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

OBJETIVO: Demostrar la utilidad del tratamiento génico (TG) *in vivo* en los tumores subcutáneos de cáncer de pulmón murino.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se inyectaron a ratones C57BL/6 por vía subcutánea 5×10^5 células de la línea de cáncer de pulmón murino de Lewis. A los 10 días se formaron tumores subcutáneos de unos 5 mm de diámetro. En ese momento se trataron mediante inyección intratumoral con un adenovirus recombinante defectivo portador del gen de la timidina (AdCMV-Tk), o del gen de la interleucina 12 (AdCMV-IL12), o con células dendríticas (CD) singénicas transducidas con el gen de la interleucina 12 (CD-IL12). Como grupos control se incluyeron tumores tratados con suero salino o con un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ), que es un gen indicador sin efecto terapéutico. El número de animales por grupo osciló entre 14 y 25 con adenovirus y entre 10 y 12 con CD. A continuación se realizó un seguimiento del tamaño tumoral desde el primer día de tratamiento hasta la tercera (adenovirus) o cuarta (CD) semanas para comparar su evolución.

RESULTADOS: Se objetivó una disminución significativa del crecimiento de los tumores subcutáneos en los grupos tratados con AdCMV-Tk, AdCMV-IL12 y CD-IL12 comparados con los grupos control tratados con suero salino y AdCMV-LacZ. En el grupo AdCMV-Tk esta diferencia fue estadísticamente significativa desde el día 7, en AdCMV-IL12 desde el día 9 y en CD-IL12 desde el día 10 y se mantuvo hasta el final del seguimiento.

CONCLUSIONES: El TG con AdCMV-Tk, AdCMV-IL12 o CD-IL12 es efectivo en nuestro modelo de tumores subcutáneos de células de carcinoma pulmonar de Lewis, ya que es capaz de disminuir su tasa de crecimiento de forma significativa respecto a los grupos de control.

Palabras clave: Tratamiento génico. Cáncer de pulmón. Adenovirus. Timidina. Interleucina 12. Células dendríticas.

Use of Gene Therapy in a Subcutaneous Murine Model of Lung Cancer

OBJECTIVE: To assess the effectiveness of *in vivo* gene therapy to treat subcutaneous tumors generated from murine lung cancer cells.

MATERIAL AND METHODS: C57BL/6 mice received subcutaneous injections of 5×10^5 cells from the murine Lewis lung cancer cell line. By 10 days, subcutaneous tumors of approximately 5 mm diameter were formed. At that point, treatment was provided by intratumor injection of a replication-defective recombinant adenovirus carrying the gene for thymidine kinase (AdCMV-Tk) or interleukin (IL) 12 (AdCMV-IL12), or by injection of syngeneic dendritic cells previously transduced with adenovirus containing the IL-12 gene (DC-IL12). Control groups were treated with saline or adenovirus containing the gene for β -galactosidase (AdCMV-LacZ), which functions as a reporter gene and does not have a therapeutic effect. The number of animals in each group ranged from 14 to 25 in experiments using adenovirus and from 10 to 12 in experiments using dendritic cells. Tumor size was followed for 3 weeks in the case of treatment with adenovirus and 4 weeks for treatment with dendritic cells.

RESULTS: A significant reduction in subcutaneous tumor growth was observed in the groups treated with AdCMV-Tk, AdCMV-IL12, and DC-IL12 compared with control groups treated with saline or AdCMV-LacZ. The difference was statistically significant from day 7 of treatment in the AdCMV-Tk group, from day 9 in the AdCMV-IL12 group, and from day 10 in the DC-IL12 group, and in all cases it was maintained until the end of the follow-up period.

CONCLUSIONS: Gene therapy with AdCMV-Tk, AdCMV-IL12, or DC-IL12 is effective in our model of subcutaneous tumors arising from cells of the Lewis lung cancer cell line. The treatment leads to a significant reduction in tumor growth compared with control groups.

Key words: Gene therapy. Lung cancer. Adenovirus. Thymidine kinase. Interleukin 12. Dendritic cells.

Trabajo realizado gracias a la ayuda de una beca Becario SEPAR, convocatoria 1999, y una beca de la Fundación Echebano, convocatoria 2000.

Correspondencia: Dr. M. Rodrigo Garzón.
P.º de la Estación, 42, 9.º B. 23008 Jaén. España.
Correo electrónico: manrrogar@yahoo.es.

Recibido: 13-9-2005; aceptado para su publicación: 28-2-2006.

Introducción

El tratamiento génico (TG) consiste en la utilización de material genético con finalidad terapéutica¹. Es una modalidad de tratamiento nueva que aparece en la última década gracias a los avances realizados en microbiología,

virología, química orgánica, biología molecular, bioquímica, biología celular, genética e ingeniería genética². Se aleja de las moléculas empleadas por la farmacología clásica utilizando en su lugar genes y vectores. En la actualidad la oncología es su área de mayor estudio, y el carcinoma broncogénico ocupa un lugar destacado³.

Los vectores se dividen en 2 grandes grupos: los víricos y los no víricos^{4,5}. En cuanto al material genético, son innumerables los genes que pueden utilizarse con fines terapéuticos. En nuestro caso se utilizó un vector vírico, en concreto un adenovirus (Ad) defectivo recombinante de primera generación serotipo 5⁶. Este virus no es capaz de replicarse por sí mismo (defectivo), ya que se sustituyó la parte del genoma necesaria para su replicación por el gen de interés (recombinante). Como material genético se utilizaron los genes de la timidincinasa (Tk) y de la interleucina 12 (IL-12).

Son varios los enfoques utilizados en el TG del cáncer. Además, se pueden combinar varias estrategias y asociar con los tratamientos convencionales⁷. En este trabajo se utilizó la estrategia de los genes suicidas con el gen de la Tk y la inmunoterapia con el gen de la IL-12 y células dendríticas (CD) transducidas con IL-12 (CD-IL12). La Tk transforma el ganciclovir (GCV) en GCV-trifosfato altamente tóxico para las células⁸. La inmunoterapia aumenta la respuesta inmunitaria del huésped frente al tumor para eliminarlo. Se puede conseguir utilizando citocinas (IL-12)⁹ o modificando células del sistema inmunitario (CD-IL12)¹⁰⁻¹².

En el presente trabajo se estudió la utilidad del TG con estrategias de genes suicidas e inmunoterapia en modelos subcutáneos de cáncer de pulmón murino.

Material y métodos

Animales y líneas celulares

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6, de 6 semanas de edad, suministradas por Harlan (Barcelona, España), que recibieron los cuidados adecuados según los criterios vigentes en nuestra institución.

Para los experimentos *in vitro* se utilizaron 3 líneas celulares humanas de cáncer de pulmón –A549 (adenocarcinoma), HTB58 (carcinoma epidermoide) y H441 (adenocarcinoma bronquioloalveolar)–, y una línea celular de cáncer de pulmón murino denominada Lewis lung carcinoma (LLC). Para los experimentos *in vivo* se utilizó LLC, que es una línea singénica para ratones C57BL/6. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Las LLC y A549 se mantuvieron en cultivo con medio tipo DMEM y HTB58 y H441 con RPMI. Ambos se suplementaron con un 10% de suero vacuno fetal (SVF), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml). Se incubaron a 37 °C con anhídrido carbónico al 5%.

Construcción de los adenovirus

Se construyeron 3 Ad con el gen de la Tk, de la IL-12 y de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Este último es un gen reportero no terapéutico, que se utilizó como control. Todos los genes se colocaron bajo el control del promotor universal del citomegalovirus (CMV). La construcción de los mismos se realizó en los Laboratorios de la Unidad de Terapia Génica dependiente del Departamento de Medicina Interna de la Clínica Universitaria de Navarra. Se realizó de acuerdo con el protocolo publicado anteriormente^{13,14}.

Células dendríticas singénicas

Se obtuvieron de la médula ósea de fémur y tibia de ratones singénicos. Se realizó según el protocolo publicado previamente por nuestro grupo¹⁵. Se infectaron *in vitro* con un AdCMV-IL12 utilizando una relación virus/célula (MOI) de 3.000.

Transducción in vitro de las líneas celulares con AdCMV-LacZ

Se sembraron 2×10^5 células de cada línea en 2 ml de DMEM suplementado con 2% SVF o RPMI con 2% SVF según el caso. A las 24 h se retiró el medio y se infectaron con AdCMV-LacZ en un volumen de 500 μ l de medio sin suplementar por pocillo. A las 4 h se añadieron 1,5 ml de DMEM suplementado con 2% SVF o RPMI con 2% SVF en cada pocillo y se incubaron 48 h más. Se utilizaron MOI de 1, 10, 100, 1.000 y 10.000. Se dejó un pocillo de control con DMEM sin infectar con el Ad. A los 2 días se retiró el medio y se fijaron las células con glutaraldehído. Después se añadieron 500 μ l por pocillo de solución X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa). Se incubaron 4 h más a 37 °C. Esta solución tiñe de azul las células que contienen en su citoplasma la proteína β -galactosidasa. De esta manera las células transducidas por AdCMV-LacZ que contienen la proteína codificada por el transgén se verán de color azul. En un microscopio óptico se puede contar el número de células azules en relación con el total de células y calcular el porcentaje de transfección. Este experimento se repitió en 2 ocasiones y se contabilizaron en cada una 5 campos por pocillo.

Transducción in vitro de la línea LLC con AdCMV-Tk

El día 1 se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en 2 placas de 6 pocillos con 2 ml de DMEM suplementado con 2% SVF. El día 2 se infectaron los pocillos con AdCMV-Tk, para lo cual se retiró el medio y se reemplazó con 500 μ l de DMEM sin suplementar con distintas MOI de AdCMV-Tk. Se dejó 4 h a 37 °C, tras lo cual se añadieron 1,5 ml de DMEM con 2% SVF en cada pocillo. Los 5 días siguientes se reemplazó a diario el medio por otro con distintas concentraciones de GCV. En una de las placas se utilizó una concentración fija de GCV, en nuestro caso, de 100 μ M, con distintas MOI (10.000, 1.000, 100, 10 y 1). En la otra se utilizó una MOI fija de 100 con concentraciones de 500, 250, 100, 50 y 25 μ M de GCV. En ambas placas se dejó un pocillo de control. En la primera se trató con GCV, pero no se infectó con AdCMV-Tk. En la segunda se infectó con AdCMV-Tk, pero no se trató con GCV. El día 7 se contó el número de células vivas de los pocillos por exclusión utilizando azul tripano. Este experimento se repitió en 2 ocasiones para comprobar los resultados.

Transducción in vivo de tumores subcutáneos de LLC con AdCMV-LacZ

Se inyectaron 5×10^5 células LLC de forma subcutánea en el flanco de 3 ratones C57BL/6. Cuando los tumores alcanzaran un diámetro de 5 \times 5 mm, se inyectaron de forma intratumoral con AdCMV-LacZ. Se utilizó una dosis de 1×10^9 pfu (unidades formadoras de placa) en un volumen de 40 μ l de suero salino (SS). A los 2 días se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores subcutáneos, que se incluyeron en OCTTM (Tissue-Tek Sakura[®]) e inmediatamente se congelaron en metilbutano sumergido en nitrógeno líquido. Se guardaron a –80 °C. Los cortes histológicos se realizaron con la ayuda de un crióstato. Para teñirlos, primero se fijaron con glutaraldehído durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con una solución tamponada con fosfatos, para dejarlos luego toda la noche en contacto con solución X-gal. Al día siguiente se

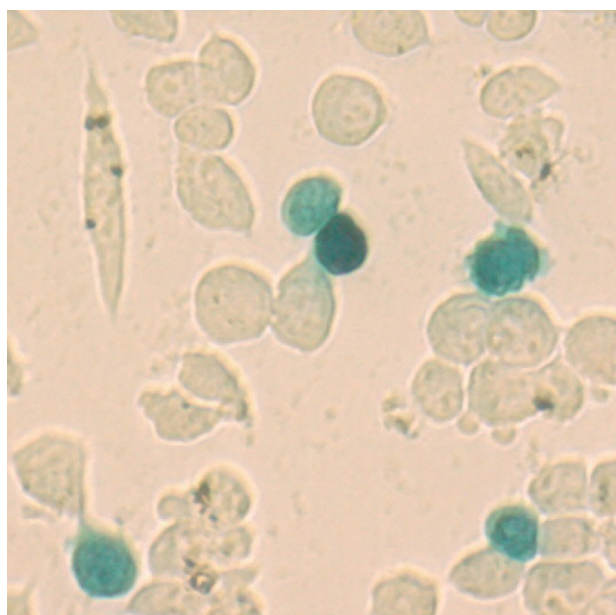


Fig. 1. Células de carcinoma pulmonar de Lewis *in vitro* transducidas con un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ). La imagen corresponde a una relación virus/células de 1.000.

TABLA I
Transducción *in vitro* con un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ)

MOI	LLC	H441	HTB58	A549
Control	0	0	0	0
1	0	1%	3%	5%
10	0	4%	20%	24%
100	0	29%	40%	90%
1.000	15%	64%	100%	100%
10.000	42%	100%	100%	100%

MOI: ratio virus/célula; LLC: Lewis lung carcinoma; HTB58: carcinoma epidermoide; A549: adenocarcinoma; H441: adenocarcinoma bronquioloalveolar.

TABLA II
Transducción *in vitro* de células de Lewis lung carcinoma (LLC) con adenovirus recombinante defectivo portador del gen de la timidincinasa (AdCMV-Tk)

MOI de 100	
Células vivas (%)	GCV (mM)
100	0
8,3	25
6,4	50
3,8	100
0,9	250
0,3	500
100 mM de GCV	
Células vivas (%)	MOI
100	0
75	1
5	10
3,4	100
0	1.000
0	10.000

MOI: ratio virus/célula; GCV: ganciclovir.

lavaron con solución tamponada con fosfatos y se observaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse E 800. Las células transducidas por el Ad aparecían teñidas de color azul.

Modelo subcutáneo y tratamiento

Se procedió de igual forma que en el apartado anterior para la inducción de tumores subcutáneos. Cuando alcanzaron 5×5 mm de diámetro, se realizó una inyección intratumoral con los Ad o las CD. Los animales se anestesiaron para la inducción tumoral y el tratamiento con una inyección intraperitoneal de clorhidrato de tiazina y ketamina. Se formaron 4 grupos con Ad: 2 de control, tratados con SS (n = 25 en Tk; n = 16 en IL-12) y AdCMV-LacZ (n = 23 en Tk; n = 14 en IL-12), y 2 terapéuticos con AdCMV-Tk (n = 23) y AdCMV-IL12 (n = 17). Los tratamientos se realizaron en $40 \mu\text{l}$ de SS. La dosis de Ad que se utilizó fue de 1×10^9 pfu en el grupo de Tk, de 5×10^8 pfu en el grupo de IL-12 y de 1×10^9 o 5×10^8 pfu en el de LacZ. Los animales del grupo de Tk recibieron tratamiento con GCV mediante inyección intraperitoneal (50 mg/kg/día en un volumen de $200 \mu\text{l}$ de SS) a los 2 días de la inyección del Ad y durante un período de 14 días. Para el experimento con CD se formaron 2 grupos: uno de control, tratado con SS (n = 10), y otro terapéutico, que recibió 5×10^5 de CD-IL12 (n = 12) de forma intratumoral en $75 \mu\text{l}$ de SS los días 1 y 3. A continuación se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores, con mediciones 3 veces por semana empezando el día del tratamiento, para comparar las áreas de los tumores entre los grupos. En el experimento con Ad el seguimiento se realizó durante 21 días, y con CD durante 28.

Análisis estadístico

Se utilizaron métodos no paramétricos para comparar las áreas de los tumores. A fin de comparar entre sí 2 grupos se utilizó el test de Wilcoxon, y para comparar más de 2 grupos, el test de Friedman. En todos los casos la significación estadística asumida fue $p \leq 0,05$. El análisis se realizó con la ayuda del programa Instat de GraphPad Software Inc.

Resultados

Transducción *in vitro* de las líneas celulares con AdCMV-LacZ

Se comprobó la eficacia de la transducción *in vitro* en varias líneas celulares con AdCMV-LacZ antes de realizar los experimentos con animales. Los resultados se muestran en la tabla I. En la columna de la izquierda figura la MOI utilizada y en las situadas a su derecha, el porcentaje de células transducidas según la línea celular. Las células transducidas con éxito se tiñen de color azul con solución X-gal (fig. 1). Las 4 líneas celulares fueron transducidas por AdCMV-LacZ, pero varió su eficacia. La línea más permisiva fue A549, y la más resistente, LLC, donde las primeras células de color azul se observaron con una MOI de 1.000 y se necesitó una MOI de 10.000 para alcanzar el 42%.

Transducción *in vitro* de células LLC con AdCMV-Tk

Se verificó la eficacia del sistema Tk-GCV *in vitro* con la línea LLC antes de su uso *in vivo*. En la tabla II se muestran los resultados obtenidos utilizando una MOI fija de 100 y una dosis fija de GCV de 100 mM. Con una MOI fija de 100 se encontró muerte celular en todas las dosis de GCV testadas. Ésta fue mayor a me-

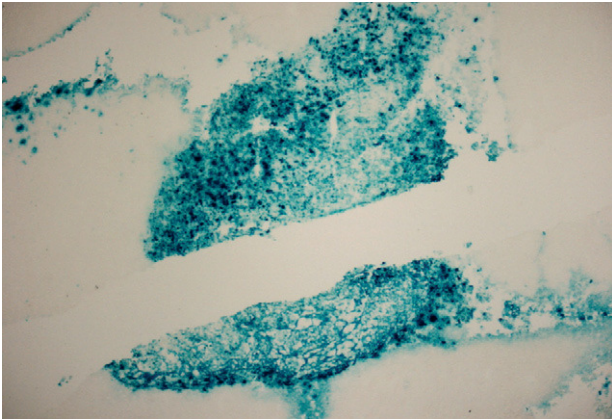


Fig. 2. Tumor subcutáneo de células de Lewis lung carcinoma tratado mediante inyección intratumoral con un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ).

didada que se aumentó la concentración del fármaco. Con una dosis fija de 100 mM de GCV se produjo muerte celular con todas las MOI, incluida la más baja, que era de 1. Ésta fue mayor conforme se aumentó la MOI. En ambos los resultados con una MOI de 100 y una dosis de GCV de 100 mM fueron similares, con un 3,8 y un 3,4% de células vivas respecto al control.

Transducción in vivo de tumores subcutáneos de células LLC con AdCMV-LacZ

Se hicieron cortes histológicos de tumores subcutáneos LLC transducidos con AdCMV-LacZ. Los resultados se muestran en la figura 2. Las células transducidas por

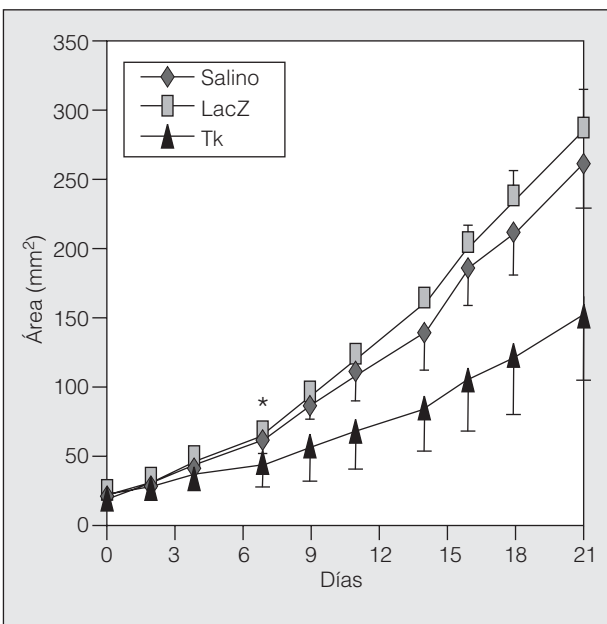


Fig. 3. Tumores subcutáneos de carcinoma pulmonar de Lewis tratados con suero salino (SS), un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ) y un adenovirus recombinante defectivo portador del gen de la timidincinasa (AdCMV-Tk). Se muestra el área tumoral en relación con el tiempo. Se observa un retraso significativo del crecimiento de los tumores en el grupo que recibió AdCMV-Tk. * $p < 0,05$.

el Ad se ven de color azul en el microscopio óptico tras tinción con solución X-gal. Como se observa en la figura 2, estas células se distribuyeron a lo largo del trayecto de entrada de la aguja en el tumor.

Tratamiento de tumores subcutáneos de células LLC con AdCMV-Tk

Se formaron 3 grupos (tratados con SS, AdCMV-LacZ y AdCMV-Tk) y se realizó un seguimiento del tamaño de los tumores. Los resultados se muestran en la figura 3. En el eje de ordenadas se representa el área de los tumores (mm^2) y en el de abscisas, el tiempo transcurrido. El ritmo de crecimiento de los tumores del grupo tratado con AdCMV-Tk y GCV fue más lento. Esto se tradujo en un área tumoral menor en este grupo con respecto a los otros 2 tratados con SS y AdCMV-LacZ. Estas diferencias empezaron a los 2 días del tratamiento y fueron estadísticamente significativas a partir del día 7 y hasta la finalización del estudio, con un valor de $p < 0,05$. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos SS y AdCMV-LacZ.

Tratamiento de tumores subcutáneos de células LLC con AdCMV-IL12

Se formaron 3 grupos (tratados con SS, AdCMV-LacZ y AdCMV-IL12) y se realizó un seguimiento del tamaño de los tumores. Los resultados se representan en la figura 4. En el eje de ordenadas figura el área tumoral (mm^2) y en el de abscisas, los días de seguimiento. Se observó un retraso del crecimiento de los tumores en el grupo tratado con AdCMV-IL12 con respecto a los otros

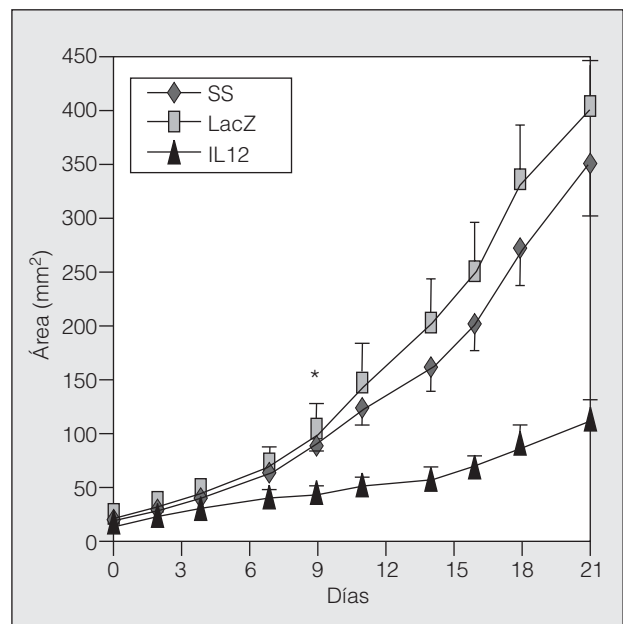


Fig. 4. Tumores subcutáneos de carcinoma pulmonar de Lewis tratados con suero salino (SS), un adenovirus con el gen de la β -galactosidasa (AdCMV-LacZ) y un adenovirus recombinante defectivo portador del gen de la interleucina 12 (AdCMV-IL12). Se muestra el área tumoral en relación con el tiempo transcurrido. Se observa una disminución significativa del crecimiento de los tumores en el grupo tratado con AdCMV-IL12. * $p < 0,01$.

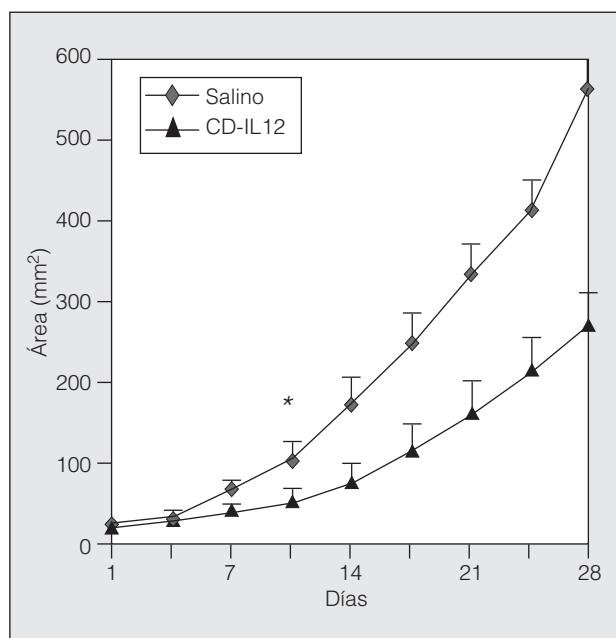


Fig. 5. Tumores subcutáneos de carcinoma pulmonar de Lewis tratados con suero salino (SS) y células dendríticas singénicas transducidas con el gen de la interleucina 12 (CD-IL12). Se muestra el área tumoral en relación con el tiempo de seguimiento. El crecimiento de los tumores en el grupo tratado con CD-IL12 fue significativamente menor. * $p < 0,05$.

2 grupos. Estas diferencias empezaron a partir del día 4 y fueron estadísticamente significativas desde el día 9 con un valor de $p < 0,01$. No hubo diferencias significativas entre los ratones tratados con SS y AdCMV-LacZ.

Tratamiento de tumores subcutáneos de células LLC con CD-IL12

Se formaron 2 grupos, que recibieron 2 inyecciones de SS o CD-IL12 los días 1 y 3. Después se realizó un seguimiento del área de los tumores, que se representa en la figura 5. En el eje de ordenadas se recoge el área tumoral, y en el de abscisas, el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento. Se encontraron diferencias entre ambos grupos desde el día 3, con un crecimiento menor de los tumores tratados con CD-IL12. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde el día 10 hasta el final del seguimiento con un valor de $p < 0,05$.

Discusión

En los últimos 60 años el carcinoma broncogénico ha pasado de ser una enfermedad poco corriente a convertirse en el cáncer más frecuente en el mundo (el 12,3% de todos los tumores malignos), con una estimación aproximada de 1,2 millones de casos nuevos en el año 2000, el 52% de ellos en países desarrollados¹⁶. Dada la baja tasa de supervivencia de los afectados de carcinoma broncogénico con los tratamientos convencionales, es necesario buscar nuevas modalidades terapéuticas. El TG está emergiendo en los últimos años como una al-

ternativa para el carcinoma broncogénico frente a otras formas tradicionales de tratamiento como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia⁷. En este trabajo se ha querido comprobar la eficacia del TG en un modelo subcutáneo de cáncer de pulmón murino.

El primer paso fue probar la eficacia del sistema *in vitro*. Para ello se infectaron células LLC en cultivo con AdCMV-LacZ. Estas células se utilizaron después para los experimentos *in vivo*. Además, se incluyeron 3 líneas humanas de cáncer de pulmón. Todas las líneas fueron susceptibles de ser transducidas mediante técnicas de TG utilizando un Ad, pero la eficacia fue distinta en cada una de ellas (tabla I y fig. 1). Los Ad penetran en las células por un proceso de endocitosis mediado por el receptor del virus *Coxsackie* y del Ad llamado CAR (*Coxsackie-Ad receptor*)¹⁷ y por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de membrana¹⁸. CAR es el punto de unión de la célula con las fibras que se encuentran en los vértices de la cápside del Ad, mientras que las integrinas de la membrana celular son las encargadas de unirse a las proteínas de la cápside vírica e internalizar el Ad en la célula¹⁸. La eficacia de transducción depende del número de receptores de membrana que tienen las células para el Ad, por lo que será distinta según la línea celular empleada¹⁹. Las células con un número elevado de receptores para el Ad tendrán una eficacia de transducción alta. Estos resultados son similares a los publicados con otras líneas celulares de cáncer de pulmón²⁰. La línea LLC requirió una MOI de 1.000 para ver las primeras células teñidas de azul y una MOI elevada, de 10.000, para llegar al 42%. Estas ratios de infección son elevadas, pero están en consonancia con lo publicado previamente utilizando esta línea, que necesitó una MOI de 20.500 para alcanzar una eficacia de transducción del 100%²¹.

El siguiente paso fue comprobar la eficacia del sistema Tk-GCV *in vitro*. Este sistema utiliza la estrategia de los genes suicidas comentada en la introducción. Se trata de introducir el gen de la Tk en las células tumorales para que conviertan el GCV, que es inocuo, en GCV-trifosfato, que es extremadamente tóxico para las células⁸. Además, este efecto no sólo es nocivo para la célula transducida, sino que afecta también a las células que la rodean por difusión del GCV-trifosfato a través de las uniones celulares. Esto se conoce como efecto de vecindad y amplifica la eficacia del sistema²². Se procedió a infectar células LLC en cultivo utilizando distintas MOI de AdCMV-Tk y GCV a diferentes concentraciones. Se trataba de comprobar si la transferencia del gen de la Tk a células LLC en cultivo era efectiva y provocaba la muerte celular después de recibir tratamiento con GCV¹³. Los resultados demostraron que este sistema funcionaba (tabla II). Incluso con MOI bajas (1, 10 y 100), en las que no se observó expresión del transgén usando AdCMV-LacZ, con el sistema Tk-GCV se produjo muerte celular. Esto se debe a que el gen reportero LacZ, que se utilizó para valorar la eficacia de transducción del Ad, tiene una sensibilidad baja e infravalora el nivel de transducción. Existen células que contienen en su citoplasma la proteína β -galactosidasa y que no se ven teñidas de azul después de la tinción con X-gal.

Esto se explica porque la cantidad de proteína es baja y el umbral de la visión no la distingue. Por este motivo, con MOI de 100, 10 y 1, en que no se observan células teñidas de azul con AdCMV-LacZ, sí se produce muerte celular con el sistema AdCMV-Tk más GCV, amplificada además por el efecto de vecindad comentado anteriormente^{12,21}.

En los experimentos *in vivo* se comprobó la eficacia de AdCMV-LacZ mediante inyección intratumoral en tumores subcutáneos de LLC. Después de la tinción se observaron células de color azul en el interior del tumor. Éstas se localizaron sobre todo en el trayecto de entrada de la aguja en el tumor (fig. 2). La eficacia *in vivo* depende de la dosis de Ad utilizada, del promotor que gobierna el transgén y de la técnica de la inyección. Es mejor realizar una sola punción para que el Ad se difunda lo más posible por el tejido tumoral, ayudado por el aumento de presión que se produce conforme se inyecta. También influye la consistencia del tumor, ya que, si es baja, el Ad escapa y puede infectar tejido peritumoral²³.

Después de comprobar que el Ad era capaz de transducir tumores subcutáneos *in vivo*, se realizó el estudio con los Ad terapéuticos. Se inyectó de forma intratumoral SS, AdCMV-LacZ y AdCMV-Tk. Las células tumorales transducidas por AdCMV-Tk producen Tk y van a transformar el GCV en GCV-trifosfato, que resulta tóxico para la célula en división por inhibir la ADN-polimerasa. Su efecto se amplifica por el fenómeno de vecindad, que también funciona *in vivo*^{8,24}. Durante el seguimiento se observó una disminución del crecimiento de los tumores en el grupo tratado con AdCMV-Tk, que empezó a los 2 días del tratamiento. Esto coincidió con el primer día de tratamiento con GCV intraperitoneal. Las diferencias aumentaron y fueron estadísticamente significativas a partir del día 7 hasta el final del estudio (fig. 3). No se evidenció en ningún momento toxicidad relacionada con la administración del Ad ni del GCV. Por lo tanto, el tratamiento con AdCMV-Tk y GCV disminuye el crecimiento de los tumores de forma significativa en este modelo, en comparación con los tratados con SS y AdCMV-LacZ.

En otro grupo de animales se trataron los tumores con SS, AdCMV-LacZ y AdCMV-IL12. La idea era aumentar la respuesta inmunitaria del huésped frente al tumor para eliminarlo. Se utilizó IL-12 porque es capaz de activar los 2 brazos efectores del sistema inmunitario, el innato y el adquirido. Además, en modelos animales ha demostrado efectos antitumorales: impide el crecimiento de nuevos tumores y provoca regresiones en los ya establecidos²⁵⁻²⁷. A los 4 días de la inyección del Ad se observó un retraso del crecimiento en los tumores del grupo tratado con AdCMV-IL12 con respecto a SS y AdCMV-LacZ. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde el día 9 y se mantuvieron hasta el final del seguimiento (fig. 4). No se observó toxicidad secundaria al tratamiento. Se utilizó una dosis de AdCMV-IL12 de 5×10^8 pfu. Dosis inferiores (de 1×10^8 y $2,5 \times 10^8$ pfu) no mostraron diferencias con los grupos control tratados con SS y AdCMV-LacZ; dosis superiores (de 1×10^9 pfu) no obtuvieron mayores be-

neficios que la de 5×10^8 pfu (datos no mostrados). Estas diferencias empezaron a los 4 días del tratamiento, 2 días más tarde que con AdCMV-Tk. Este retraso se debe a que los efectos de la Tk tras la administración de GCV son inmediatos, mientras que la IL-12 induce una cascada de citocinas secundarias, responsables últimas de sus efectos biológicos, lo que retrasa su comienzo de acción²⁸. En conclusión, se encontró un retraso significativo en la tasa de crecimiento de los tumores en este modelo tras ser tratados con AdCMV-IL12.

Por último, se inyectaron CD singénicas transducidas con un Ad para que secretaran IL-12. Como control se utilizaron animales tratados con SS. Las CD en el seno del tumor captan antígenos y los presentan al sistema inmunitario para iniciar una respuesta antitumoral^{10,12,15,29}. Se observaron diferencias entre ambos grupos a los 3 días del tratamiento, con un crecimiento menor en el grupo que recibió CD-IL12. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde el día 10 hasta el final del estudio (fig. 5). Por tanto, el tratamiento con CD-IL12 consiguió disminuir de forma significativa el crecimiento de los tumores subcutáneos.

Se puede concluir que los 3 tratamientos (AdCMV-Tk más GCV, AdCMV-IL12 y CD-IL12) fueron eficaces en nuestro modelo *in vivo*. Son capaces de disminuir la tasa de crecimiento de los tumores subcutáneos en comparación con la de los grupos control (SS y AdCMV-LacZ). Por consiguiente, en un futuro se puede plantear el TG como una nueva vía de tratamiento del carcinoma broncogénico junto a los convencionales, aunque para ello se requerirán más estudios y ensayos clínicos³⁰.

BIBLIOGRAFÍA

- Rubanyi GM. The future of human gene therapy. *Mol Aspects Med.* 2001;22:113-42.
- Carter BJ. Gene therapy as drug development. *Mol Ther.* 2000; 1:211-2.
- Albelda SM, Wiewrodt R, Zuckerman JB. Gene therapy for lung disease: hype or hope? *Ann Intern Med.* 2000;132:649-60.
- George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* 2003;10:1135-41.
- Brown MD, Schätzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm.* 2001;229:1-21.
- Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication. En: Fields BN, et al. *Fundamental virology*, Filadelfia: Lippincott-Raven; 1996. p. 2111-71.
- Giovanni C, Nanni P, Forni G. The prospects for cancer gene therapy. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22:1025-32.
- Hwang HC, Smythe WR, Elshami AA, Kucharczuk JC, Amin KM, Williams JP, et al. Gene therapy using adenovirus carrying the herpes simplex-thymidine kinase gene to treat *in vivo* models of human malignant mesothelioma and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13:7-16.
- Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in antitumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2002;13: 155-68.
- Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80 6041-5.
- Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today.* 1999;20:200-4.
- Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res.* 1999;59:4035-41.

13. Qian C, Bilbao R, Bruña 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. Mazzolini G, Qian C, Xie X, Sun Y, Lasarte JJ, Drozdik M, et al. Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther*. 1999;6:514-22.
15. Melero I, Duarte M, Ruiz J, Sangro B, Galofré JC, Mazzolini G, et al. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of establish murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther*. 1999;6:1779-84.
16. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 8:4-66.
17. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275:1320-3.
18. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993;73:309-19.
19. Takayama K, Ueno H, Pei X-H, Nakanishi Y, Yatsunami J, Hara N. The levels of integrin avb5 may predict the susceptibility to adenovirus-mediated gene transfer in human lung cancer cells. *Gene Ther*. 1998;5:361-8.
20. Batra RK, Olsen JC, Pickles RJ, Hoganson DK, Boucher RC. Transduction of non-small cell lung cancer cells by adenoviral and retroviral vectors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:402-10.
21. Kwong Y-L, Chen S-H, Kosai K, Finegold M, Woo SLC. Combination therapy with suicide and cytokine genes for hepatic metastases of lung cancer. *Chest*. 1997;112:1332-7.
22. Mesnil M, Yamasaki H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res*. 2000;60:3989-99.
23. Cusack JC, Spitz FR, Nguyen D, Zhang W-W, Cristiano RJ, Roth JA. High levels of gene transduction in human lung tumors following intralesional injection of recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 1996;3:245-9.
24. Nagamachi Y, Tani M, Shimizu K, Yoshida T, Yokota J. Suicidal gene therapy for pleural metastasis of lung cancer by liposome-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Ther*. 1999;6:546-53.
25. Cavallo F, Signorelli P, Giovarelli M, Musiani P, Modesti A, Brunda MJ, et al. Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1049-58.
26. Nasu Y, Bangma CH, Hull GW, Lee HM, Hu J, Wang J, et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther*. 1999;6:338-49.
27. Sumimoto H, Tani K, Nakazaki Y, Tanabe T, Hibino H, Wu M-S, et al. Superiority of interleukin-12-transduced murine lung cancer cells to GM-CSF or B7-1 (CD80) transfectants for therapeutic antitumor immunity in syngenic immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther*. 1998;5:29-37.
28. Bacon CM, Petricoin EF, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA, et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7307-11.
29. Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, et al. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med*. 1997;186:1213-21.
30. Roth JA, Grammer SF. Gene replacement therapy for non-small cell lung cancer: a review. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18:215-29.