

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Revisión

Terapia génica citotóxica para el tratamiento del cáncer cerebral

Mariela Alejandra Moreno Ayala* y Marianela Candolfi

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED, UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de abril de 2014

Aceptado el 12 de mayo de 2014

On-line el 21 de junio de 2014

Palabras clave:

Glioblastoma multiforme

Terapia génica

Cinasa de timidina

Toxinas quiméricas

Vectores adenovirales oncolíticos

RESUMEN

Introducción: El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más agresivo y frecuente. A pesar de los avances en el tratamiento de pacientes con GBM, que incluye su remoción quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, el pronóstico es muy desfavorable, e incluso en los centros más desarrollados del mundo, la sobrevida a 2 años es del 8-20%. Este tumor es muy difícil de tratar ya que las células de GBM tienen una resistencia intrínseca a las terapias tradicionales. Además, debido a su invasividad, el tumor presenta recurrencias y es letal en casi todos los pacientes. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas terapias para mejorar la sobrevida de los pacientes con GBM.

Objetivo: En este artículo revisaremos las estrategias de terapia génica desarrolladas para inducir citotoxicidad específica en células de GBM.

Desarrollo: Describiremos especialmente las estrategias que utilizan vectores adenovirales, ya que son los vectores más popularmente utilizados en el tratamiento del GBM. Discutiremos estrategias que utilizan adenovirus recombinantes no replicativos para la transferencia de moléculas citotóxicas condicionales, como la cinasa de timidina y de citocinas proapoptóticas. También revisaremos las estrategias que utilizan vectores adenovirales oncolíticos, que replican específicamente en células tumorales, induciendo su lisis.

Conclusiones: La terapia génica es una herramienta muy útil para inducir apoptosis en GBM. La versatilidad de los vectores de la terapia génica permite adaptarlos para mejorar su especificidad y aumentar su eficacia. Estas características, sumadas al buen perfil neuropatológico de los vectores adenovirales, hacen de la terapia génica citotóxica una modalidad muy promisoría para combinar con otros agentes citotóxicos y con estrategias inmunoestimulantes para el tratamiento del GBM.

© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marucandolfi@gmail.com (M. Candolfi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2014.05.002>

1853-0028/© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Citotoxic gene therapy for the treatment of brain cancer

A B S T R A C T

Keywords:

Glioblastoma multiforme
Gene therapy
Thymidine kinase
Chimeric toxins
Oncolytic adenoviral vectors

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and aggressive primary brain tumor. In spite of recent advances in the treatment of this tumor, which consists of neurosurgery followed by radiotherapy and chemotherapy, the prognosis of these patients remains dismal, with 2-year survival rates of with 8-20%. This tumor is very difficult to treat due to the intrinsic resistance of GBM cells to conventional therapies. Additionally, due to its invasiveness, the tumor recurs and kills virtually all the patients with GBM. Thus, it is crucial to develop novel therapies to improve the survival of these patients.

Aim: In this article we review gene therapy strategies developed to induce specific cytotoxicity in GBM cells.

Development: We review gene therapy strategies that use adenoviral vectors, which are the most extensively used for the treatment of GBM. We will discuss strategies that employ recombinant non-replicative adenoviral vectors for the delivery of conditionally cytotoxic molecules and pro-apoptotic cytokines. We will also describe strategies that use oncolytic adenoviral vectors, which specifically replicate in tumor cells inducing their lysis.

Conclusions: Gene therapy is a very valuable tool to induce apoptosis in GBM. The versatility of gene therapy vectors allows their manipulation to improve their specificity and efficacy. These features and the very acceptable neuropathological profile of these vectors makes cytotoxic gene therapy a very promising therapeutic strategy to combine with other cytotoxic agents and immunostimulatory strategies for the treatment of GBM.

© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Cada año en nuestro país se diagnostican 1.600 nuevos pacientes con tumores cerebrales primarios (www.msal.gov.ar/inc/equipos.analisis.php). El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más frecuente en adultos, constituyendo un 25% de los tumores cerebrales primarios. A pesar de los avances en su tratamiento, que incluye la remoción quirúrgica, seguida de radioterapia y quimioterapia, el pronóstico es muy desfavorable, e incluso en los centros más desarrollados del mundo, la supervivencia a 2 años es del 8-20%. Los desafíos terapéuticos que encierra esta enfermedad incluyen: la invasividad del tumor en el tejido cerebral, la resistencia de las células de glioma a las terapias tradicionales, el microambiente tumoral inmunosupresor y el inmunoprivilegio del sistema nervioso central. El carácter invasivo de estos tumores hace que la remoción quirúrgica completa sea virtualmente imposible, por lo que el tumor presenta recurrencias y es letal en casi todos los pacientes. Por ello, es importante el desarrollo de terapias alternativas. La inducción de muerte celular en el GBM es esencial en el tratamiento de estos tumores, no solo para reducir el tamaño del tumor, sino porque la apoptosis produce la liberación de moléculas inflamatorias intracelulares que favorecen la inmunidad antitumoral^{1,2}.

La terapia génica constituye una herramienta muy útil para la transferencia de genes citotóxicos a los tumores cerebrales. Los vectores adenovirales son ideales para la transferencia genética en el sistema nervioso central³, por ello han sido los más utilizados en neuro-oncología traslacional. Estos vectores tienen la habilidad de infectar eficientemente células normales y tumorales, no generan neurotoxicidad a dosis

terapéuticamente efectivas y pueden ser producidos en altos títulos con relativa facilidad. Además, dado que estos vectores permanecen episomales, no presentan riesgo de mutagénesis insercional. En este artículo, describiremos algunas estrategias terapéuticas experimentales que utilizan vectores adenovirales recombinantes no replicativos (Ad) para transferir moléculas proapoptóticas a las células tumorales. También discutiremos el uso de vectores adenovirales oncolíticos de replicación condicional (CRAd), que replican específicamente en las células tumorales, induciendo su lisis. Estas estrategias buscan inducir muerte celular específicamente en células de GBM, sin afectar el parénquima cerebral que rodea al tumor.

Desarrollo

Citocinas proapoptóticas

La administración de vectores Ad que codifican para citocinas proapoptóticas es una estrategia interesante para inducir citotoxicidad en células de GBM (fig. 1), ya que la expresión de los respectivos receptores de muerte ha sido detectada en especímenes de GBM humano. Distintos vectores que codifican para TNF- α , TRAIL y FasL fueron construidos y evaluados en roedores portadores de GBM intracraneal^{1,4-8}. A pesar de que *in vitro* estos vectores producen potentes efectos proapoptóticos en células de GBM, su efecto *in vivo* en modelos de GBM es más discreto¹. La administración intratumoral de un Ad que codifica para TNF- α no afecta a la supervivencia de ratas portadoras de GBM intracraneal, mientras que la sobreexpresión de TRAIL solo incrementa moderadamente la supervivencia mediana, sin

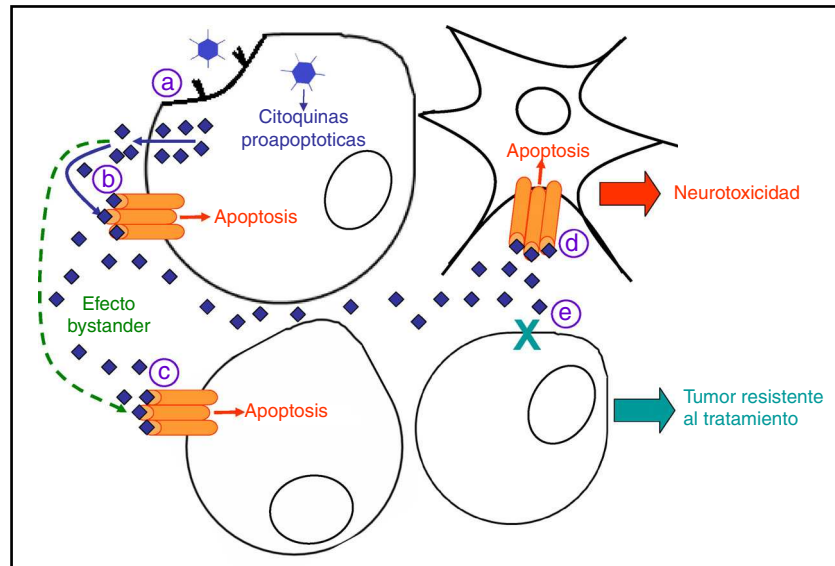


Figura 1 – Terapia génica con citocinas proapoptóticas. Esta estrategia utiliza vectores que codifican para citocinas proapoptóticas, como TNF- α , TRAIL o FasL, para inducir apoptosis en células tumorales que expresan el receptor de muerte correspondiente. Luego de que los vectores infectan a las células tumorales (a), las citocinas son sintetizadas y liberadas al espacio intercelular, donde interactúan con receptores de muerte presentes en la misma célula (b) o en células tumorales vecinas (efecto bystander, c), induciendo la activación de caspasas y finalmente la muerte por apoptosis. Dado que los receptores de muerte también pueden expresarse en células normales del parénquima cerebral (d), esta estrategia conlleva el riesgo de producir neurotoxicidad. Además, muchas células tumorales no expresan receptores de muerte (e), de modo que son insensibles a esta estrategia, pudiendo seleccionarse y generar un tumor resistente a esta terapia.

inducir regresión tumoral completa en los animales tratados¹. El vector con mayor eficacia entre los evaluados es Ad-FasL, que induce regresión tumoral y sobrevida a largo plazo en aproximadamente el 30% de las ratas portadoras de GBM intracraneal, cuando el tratamiento se aplica 4 días luego de la inoculación tumoral¹. Sin embargo, si el tratamiento con Ad-FasL se pospone hasta el día 10, cuando los tumores son más grandes y el modelo es más similar a lo que ocurre en la clínica, la terapia falla por completo¹. La relativa baja eficacia de estos vectores ha sido atribuida en parte a la presencia de receptores solubles para TNF- α y FasL que neutralizan las citocinas proapoptóticas^{1,9,10}. Por otra parte, dado que las citocinas proapoptóticas tienen como blanco las células tumorales que expresan receptores de muerte específicos, estos tratamientos pueden llevar a la selección de células tumorales que no expresan dicho receptor y el tumor puede volverse resistente a la terapia. Sin embargo, ha sido descrito que las células de GBM pueden aumentar la expresión de receptores de muerte, ante injurias como la irradiación o la quimioterapia^{7,11-13}, por lo tanto la combinación de vectores proapoptóticos con terapias tradicionales podría tener un beneficio clínico significativo.

Dado que en la clínica los vectores de terapia génica son inyectados en los márgenes del tumor luego la resección quirúrgica¹⁴, es de vital importancia utilizar agentes proapoptóticos cuyos efectos citotóxicos sean específicos para las células de GBM y no afecten al parénquima cerebral no neoplásico (fig. 1). La administración de vectores Ad que codifican para TRAIL o FasL en el cerebro de ratas normales provoca neurotoxicidad aguda severa¹, lo que se correlaciona con la expresión de receptores para TRAIL y FasL en células del

parénquima cerebral normal¹⁵⁻¹⁷. La citotoxicidad de estos vectores podría ser reducida si la expresión de estas citocinas estuviera controlada por vectores específicos de GBM, como hTERT¹⁸, o promotores que se activan específicamente en condiciones de hipoxia características del GBM¹⁹. Una desventaja de los Ad controlados por promotores específicos de célula consiste en que su eficiencia de traducción es significativamente menor que los promotores ubicuos²⁰, requiriendo mayores dosis de Ad para lograr eficacia terapéutica, lo cual puede llevar a reacciones inflamatorias^{21,22}. Por otra parte, existen promotores inducibles, los cuales dependen de la administración sistémica de inductores atóxicos, como la doxiciclina, para inducir la expresión génica²³. Los promotores radioinducibles dependen de la aplicación de radioterapia para funcionar y permiten el control espacial y temporal de la expresión génica, por lo que pueden ser útiles para dirigir la expresión de este tipo de vectores que codifican para agentes altamente citotóxicos²⁴. La utilización de promotores que dependen de temozolomida también permite controlar la expresión de los Ad terapéuticos en el contexto del tratamiento de rutina para estos pacientes²⁵.

Genes suicidas

Los genes suicidas codifican para enzimas que transforman profármacos no tóxicos en moléculas citotóxicas, por eso son transgenes atractivos para utilizar en terapia génica antitumoral (fig. 2). El gen suicida que ha sido más ampliamente estudiado para el tratamiento del GMB es la cinasa de timidina del virus del herpes simple (VHS-TK)²⁶. La VHS-TK fosforila

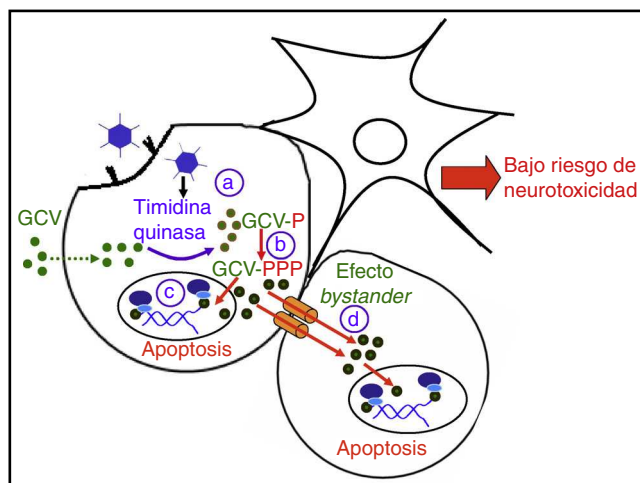


Figura 2 – Terapia génica con genes suicidas. Esta estrategia utiliza vectores que codifican para genes suicidas para inducir apoptosis en células tumorales proliferación. Luego de que el vector infecta las células tumorales, la cinasa de timidina (TK) se expresa y fosforila al profármaco ganciclovir (GCV, a), un análogo del nucleósido 2' desoxiguanosina que ingresa libremente a las células luego de su administración sistémica. El GCV-monofosfato (GCV-P) es fosforilado adicionalmente por enzimas celulares (GCV-PPP, b). El GCV-PPP accede al núcleo celular, se incorpora al ADN e inhibe a la ADN polimerasa conduciendo a la terminación de la cadena (c), por lo tanto, es altamente citotóxico en células en proliferación. El GCV fosforilado puede acceder a células vecinas a través uniones GAP e inducir apoptosis (d), por lo que presenta un importante efecto bystander. Dado que TK + GCV solo inducen apoptosis de células en proliferación, esta estrategia tiene bajo riesgo de neurotoxicidad.

el profármaco ganciclovir (GCV) a GCV monofosfato, el cual, después de su conversión a GCV trifosforilado por enzimas celulares, sustituye a la 2-deoxiguanosina trifosfato. Cuando el GCV trifosfato es incorporado a la cadena de ADN, este inhibe a la ADN polimerasa conduciendo la terminación de la misma²⁷. Dado que el GCV fosforilado puede acceder a células vecinas mediante uniones gap, esta modalidad tiene un robusto efecto bystander que amplifica el efecto citotóxico de VHS-TK²⁸ (fig. 2). Dado que el efecto bystander del TK depende de las uniones intercelulares, la sobreexpresión de las proteínas que forman dichas uniones, como las conexinas, es una estrategia que puede incrementar la eficacia terapéutica de TK. En los astrocitos, la conexina 43 (CX43) es la conexina principal y ha sido también detectada en el 75% de los especímenes de GBM humano. Ha sido demostrado recientemente que la sobreexpresión de las conexinas CX26 y CX43 por la tanshinona II_A, una sustancia química derivada de una hierba medicinal china, aumenta la sensibilidad de células de melanoma B16 a la citotoxicidad inducida por TK + GCV *in vitro* e *in vivo*²⁹. El tratamiento con ácido retinoico también incrementa la comunicación intercelular mediante uniones gap, de modo que podría incrementar la respuesta a la terapia génica de genes suicidas³⁰. Células de GBM tratadas con el inhibidor

de la histona desacetilasa 4-fenil butirato incrementa la expresión de CX43, la cual es redistribuida a la superficie celular³¹, aumentando la comunicación mediante uniones gap y amplificando el efecto apoptótico de TK + GCV³². La sobreexpresión de CX43 mediante el uso de vectores de terapia génica mejora significativamente la eficacia de TK en ratones portadores de GBM humano intracraneal³³.

Los vectores Ad que codifican para VHS-TK han sido extensamente evaluados en modelos experimentales de cáncer cerebral, como también en ensayos clínicos de pacientes con GBM. Estos vectores inducen la apoptosis en células de GBM humanas, de roedores y caninas^{2,34-36}. La inyección intratumoral de Ad VHS-TK en GBM singéncicos implantados en el cerebro de ratas conduce a la regresión tumoral y a la sobrevida a largo plazo en más del 75% de los animales si los tumores son pequeños en el momento del tratamiento (día 3-4 postimplantación)^{1,37}. Sin embargo, cuando el tratamiento se retrasa al día 10 postimplantación, el Ad VHS-TK + GCV no logra inducir regresión tumoral en estos animales^{1,37-39}. Estos hallazgos están en concordancia con los reportes clínicos que indican que el tratamiento con Ad VHS-TK + GCV solo induce una mejora discreta, aunque significativa, en la sobrevida mediana de pacientes con GBM tratados adicionalmente con terapia convencional⁴⁰. Este sistema ha sido manipulado para mejorar su eficacia y reducir su posible toxicidad, por ejemplo, los mutantes VHS-TK SR39 y SR26 exhiben gran afinidad por GCV y aciclovir⁴¹, lo que permite administrar dosis menores de los profármacos para obtener eficacia terapéutica⁴². Una cinasa de timidina derivada de la planta del tomate (toTK) ha sido descrita recientemente. La toTK tiene alta afinidad y especificidad por el azidotimidina (AZT) y muestra un efecto citotóxico potente en células de GBM humanas *in vitro*⁴³. Las ventajas de este sistema son que AZT penetra fácilmente la barrera hematoencefálica y que toTK puede eficientemente fosforilar tanto AZT como AZT-monofosfato⁴⁴.

Otra forma de incrementar la eficacia de Ad VHS-TK, así como de otras estrategias proapoptóticas, es combinarlas con estrategias inmunoterapéuticas⁴⁵. Durante la apoptosis de las células de GBM mediada por TK + GCV, se liberan proteínas intracelulares proinflamatorias que estimulan el sistema inmunitario^{1,2}. Ha sido demostrado que durante la apoptosis inducida por TK + GCV, las células de GBM liberan HMGB1, que activa al receptor tipo Toll 2 presente en las células dendríticas (CD) que infiltran el tumor, disparando una respuesta inmunitaria antitumoral que erradica el GBM intracraneal en ratas y ratones^{1,2}. La combinación del vector Ad VHS-TK con vectores que codifican para citocinas inmunoestimulantes que reclutan células presentadoras de antígeno hacia la masa tumoral o aumentan la función de células T citotóxicas, como Flt3L, IFN- α , IFN- γ e IL-2, conduce a la regresión de los tumores cerebrales, la sobrevida a largo plazo y la memoria inmunológica antitumoral en ratones y ratas portadores de GBM intracraneal^{1,2,46}. Estas observaciones sirven de fundamento para la aplicación de vectores Ad que codifican para VHS-TK en combinación con estrategias inmunoterapéuticas, las cuales pueden incluir la administración de vacunas antitumorales de células dendríticas^{1,2,47,48}.

VHS-TK + GCV sensibiliza las células de GBM al efecto citotóxico de la radioterapia y los agentes quimioterapéuticos⁴⁹, los cuales constituyen el tratamiento estándar de los

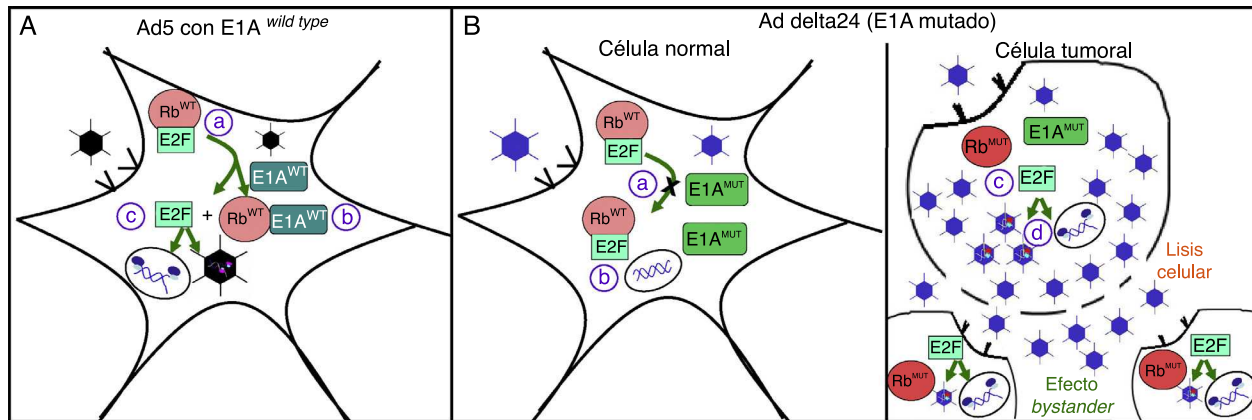


Figura 3 – Terapia génica con Ad oncolíticos. Esta estrategia utiliza vectores que replican específicamente en células tumorales induciendo su lisis. A) En células normales que no se encuentran en proliferación, la proteína de retinoblastoma (Rb) forma un complejo con E2F, el cual interviene en la replicación celular (a). Luego de la infección el Ad5 wild type sintetiza la proteína E1A, que se une a Rb, permitiendo la liberación de E2F del complejo (b). El E2F libre desencadena así la replicación viral (c) que lleva a la lisis celular. B) En el Ad delta-24, la proteína E1A ha sido mutada (E1A^{MUT}), de manera que no puede interactuar con la proteína Rb (a). De este modo, E2F no es liberado y no se estimula la replicación viral (b). En células tumorales, Rb se encuentra mutado y disociado de E2F (c), por lo tanto, E2F está libre para inducir la replicación viral luego de la infección con delta-24 (d), llevando a la lisis celular. Durante este proceso, se liberan partículas de delta-24 que infectan a células vecinas, dando lugar a un potente efecto bystander.

pacientes con GBM luego de la neurocirugía. La combinación de la terapia génica con GCV y el agente quimioterapéutico y alquilizante temozolomida tiene un efecto antitumoral sinérgico en modelos experimentales de GBM humano¹². La sinergia con temozolomida parece estar relacionada con la inhibición de las enzimas reparadoras de ADN por GCV fosforilado⁵⁰. Ad VHS-TK + aciclovir aumentan la sensibilidad de las células de GBM de rata a la radioterapia *in vitro* e *in vivo*^{49,51}. El tratamiento de modelos murinos de GBM humano con Ad VHS-TK aumenta la eficacia de la radioterapia y reduce la ocurrencia de efectos secundarios neurológicos en ratones irradiados⁵². Ha sido sugerido que el efecto sinérgico de VHS-TK con la radiación podría estar mediado por un mecanismo de inmunestimulación mediado por VHS-TK⁵³. En conclusión, considerando que varios estudios preclínicos y clínicos muestran que VHS-TK tiene un efecto sinérgico con otros agentes citotóxicos, como también con estrategias inmunoestimulantes, es importante continuar el desarrollo de esta estrategia, la cual ha demostrado ser segura al ser inyectada en el cerebro de cientos de pacientes con GBM en múltiples ensayos clínicos en diferentes países^{40,53-55}.

Adenovirus oncolíticos

Inicialmente, los abordajes de terapia génica para el tratamiento de tumores cerebrales utilizaron vectores Ad para la transferencia de genes terapéuticos. Los vectores recombinantes no replicativos portan una delección en la región E1 que hace al virus incapaz de replicar y dependiente de un virus *helper*⁵⁶. Las limitaciones en la distribución de la expresión del transgén de interés utilizando estos vectores⁵⁷ motivaron el desarrollo de virus oncolíticos de replicación selectiva como una estrategia terapéutica alternativa para inducir apoptosis en células tumorales. Los adenovirus replicativos

condicionales (CRAd) pueden replicar selectivamente en células tumorales induciendo su lisis (fig. 3). Con el objeto de mejorar su eficacia, la replicación selectiva puede ser combinada con la expresión de transgenes terapéuticos. Así, los CRAd pueden matar las células lisándolas como resultado de su ciclo replicativo y adicionalmente pueden expresar proteínas citotóxicas, estimular la producción de citocinas inflamatorias, activar la inmunidad mediada por células T o sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia⁵⁸⁻⁶⁰.

Hay varias estrategias para desarrollar CRAd. Una manera es codificar la expresión del gen E1A, que controla la replicación, bajo el control de un promotor o *enhancer* específico de tumor. Esta estrategia puede aplicarse en GBM utilizando promotores específicos de GBM, como los promotores de hTERT¹⁸, HMGB2⁶¹ o el receptor de quimiocina CXCR4⁶². Otra forma de restringir la replicación de los CRAd en las células normales es aprovechar el perfil de expresión diferencial entre una célula tumoral y una normal. Este es el caso del CRAd delta-24, en el cual el gen E1A posee una pequeña delección que restringe su interacción con la proteína de retinoblastoma (Rb), que es crítica para el funcionamiento correcto del punto de control G1. Frecuentemente, la vía p16/Rb/E2F se encuentra alterada en varios tumores, en particular en gliomas⁶³. En estas células, Rb es inactivo y no puede unirse a E2F, por lo tanto, este se haya disponible para activar el promotor E2 del CRAd y de genes celulares que regulan el ciclo celular⁶⁴. Así, delta-24 puede replicarse únicamente en células cancerígenas que posean la función Rb afectada, sin afectar a las células normales⁶⁴ (fig. 3).

Usando un enfoque similar, otro CRAd, el ONYX-015, ha sido utilizado para el tratamiento de tumores en los cuales la función del factor supresor tumoral p53 se encuentra afectada. Los adenovirus normalmente codifican para genes tempranos E1B que inhiben la función de p53. El ONYX-015 posee una delección en el gen E1B, de modo que cuando infectan células

normales con p53 activo, no pueden replicarse. Sin embargo, cuando este virus infecta células con p53 mutado replica y causa la lisis celular⁶⁵. Es importante mencionar, que el papel de p53 en la selectividad de ONYX-015 es aún controvertido, ya que ha sido demostrado que este vector podría replicarse en células tumorales con p53 funcional⁶⁶. Al parecer, la replicación selectiva en las células tumorales estaría determinada por la capacidad de estas células de exportar ARN viral tardío en ausencia de E1B⁶⁷.

Una estrategia para mejorar la eficacia clínica de estos vectores es aumentar su infectividad. Una manera de aumentar la infectividad de estos vectores es modificar las proteínas de la cápside que se encuentran involucradas en la unión y entrada a la célula tumoral. Por ejemplo, la infectividad del CRAd delta-24 ha sido aumentada por la incorporación de un péptido de 3 aminoácidos a la fibra *knob*, que aumenta su unión a integrinas α_v , mejorando la entrada del CRAd a la célula⁶⁸. Delta-24 RGD ha mostrado un aumento en su capacidad infectiva en células de cáncer ovárico y en modelos *in vitro* e *in vivo* de gliomas malignos⁶⁹.

Un problema potencial de estos vectores es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti-Ad, que impiden la infectividad de los vectores luego de su administración repetida⁷⁰. Sin embargo, los Ad replicativos competentes han demostrado ser seguros para el tratamiento de pacientes⁷¹. Chiocca et al. evaluaron el ONYX-015 en un ensayo clínico de fase I, que incluyó a 24 pacientes con glioma maligno recurrente. Los autores concluyeron que la administración de ONYX-015 es segura en las dosis reportadas⁷². Además, en la actualidad, hay 2 ensayos clínicos que utilizan delta-24 RGD en pacientes con GBM, uno en fase I (NCT00805376) y un segundo en fase I/II (NCT01582516).

Es importante mencionar que existe otro tipo de vectores oncolíticos no adenovirales que han sido desarrollados para la terapia antitumoral. Russell y Peng han trabajado con el virus del sarampión, el cual adquiere tropismo por el receptor CD46 durante la adaptación en cultivo⁷³. Este receptor se encuentra sobreexpresado en células humanas tumorales en comparación con células normales. A alta densidad celular de este receptor, la infección con estos vectores oncolíticos lleva a la fusión intercelular, un efecto citopático clásico del virus del sarampión, que conlleva a la lisis celular⁷³. En particular, una cepa atenuada del virus, derivada del linaje de la vacuna Edmonston, fue genéticamente modificada para producir el antígeno carcinoembrionario, que sirve como marcador de la expresión génica viral⁷⁴. Este vector (MV-CEA) se encuentra en ensayo clínico fase I para pacientes con glioblastomas recurrentes (NCT00390299).

Conclusiones

La terapia génica es una herramienta muy útil para inducir apoptosis en GBM. Las posibilidades de manipular los vectores de terapia génica para restringir la expresión de los transgenes citotóxicos a las células tumorales utilizando promotores específicos de célula permiten incrementar la especificidad de estas terapias. Además, la posibilidad de utilizar promotores inducibles, dependientes de fármacos o radioterapia, permite controlar la expresión de los transgenes tanto temporal como

espacialmente, reduciendo aún más la posibilidad de desarrollar efectos colaterales. Esta versatilidad, sumada al buen perfil neuropatológico de los Ad, hace de la terapia génica citotóxica una modalidad muy útil para utilizar en el tratamiento del GBM.

El uso de múltiples agentes proapoptóticos parece tener efectos sinérgicos en ensayos preclínicos y en pacientes con GBM. Además, la liberación de proteínas proinflamatorias desde células en proceso de apoptosis parece ser necesaria para disparar respuestas inmunitarias inducidas por inmunoterapia con citocinas y con vacunas antitumorales. Por lo tanto, la combinación de estrategias terapéuticas parece ser el futuro del tratamiento del GBM y otros tumores. Las terapias génicas citotóxicas aquí descritas constituyen modalidades muy promisorias para combinar con otros agentes citotóxicos y con estrategias inmunoestimulantes para el tratamiento del GBM.

Financiación

Este trabajo recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET PIP 114-201101-00353 a M.C.; beca de posgrado tipo I a M.A.M.A.), la Fundación Bunge y Born (Beca Jorge Oster de perfeccionamiento en oncología a M.A.M.A.) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2012-0830 a M.C.).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Candolfi M, Yagiz K, Foulad D, Alzadeh GE, Tesarfreund M, Muhammad AK, et al. Release of HMGB1 in response to proapoptotic glioma killing strategies: Efficacy and neurotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4401-14.
2. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, et al. HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med.* 2009;6:e10.
3. Wirth T, Samaranayake H, Pikkarainen J, Maatta AM, Yla-Herttuala S. Clinical trials for glioblastoma multiforme using adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11:485-92.
4. Ambar BB, Frei K, Malipiero U, Morelli AE, Castro MG, Lowenstein PR, et al. Treatment of experimental glioma by administration of adenoviral vectors expressing Fas ligand. *Hum Gene Ther.* 1999;10:1641-8.
5. Kim CY, Jeong M, Mushiake H, Kim BM, Kim WB, Ko JP, et al. Cancer gene therapy using a novel secreted trimeric TRAIL. *Gene Ther.* 2006;13:330-8.
6. Nafe C, Cao YJ, Quinones A, Dobberstein KU, Kramm CM, Rainov NG. Expression of mutant non-cleavable Fas ligand on retrovirus packaging cells causes apoptosis of immunocompetent cells and improves prodrug activation gene therapy in a malignant glioma model. *Life Sci.* 2003;73:1847-60.
7. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2000;60:847-53.

8. Enderlin M, Kleinmann EV, Struyf S, Buracchi C, Vecchi A, Kinscherf R, et al. TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2009;16:149–60.
9. Chen TC, Hinton DR, Sippy BD, Hofman FM. Soluble TNF-alpha receptors are constitutively shed and downregulate adhesion molecule expression in malignant gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:541–50.
10. Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, et al. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res.* 2001;61:2759–65.
11. Hingtgen S, Ren X, Terwilliger E, Classon M, Weissleder R, Shah K. Targeting multiple pathways in gliomas with stem cell and viral delivered S-TRAIL and temozolomide. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:3575–85.
12. Rieger J, Frank B, Weller M, Wick W. Mechanisms of resistance of human glioma cells to Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand cell. *Physiol Biochem.* 2007;20(1–4):23–34.
13. Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, et al. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1998;58:1593–8.
14. Pulkkanen KJS, Yla-Herttuala. Gene therapy for malignant glioma: Current clinical status. *Mol Ther.* 2005;12: 585–98.
15. de la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1997;152:73–83.
16. Dorr J, Bechmann I, Waiczies S, Aktas O, Walczak H, Krammer PH, et al. Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain. *J Neurosci.* 2002;22:RC209.
17. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:821–31.
18. Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, Hirohata S, Kyo S, Iwamaru A, et al. Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status. *Hum Gene Ther.* 2005;16:685–98.
19. Ozawa T, Hu JL, Hu LJ, Kong EL, Bollen AW, Lamborn KR, et al. Functionality of hypoxia-induced BAX expression in a human glioblastoma xenograft model. *Cancer Gene Ther.* 2005;12:449–55.
20. Southgate TD, Bain D, Fairbanks LD, Morelli AE, Larregina AT, Simmonds HA, et al. Adenoviruses encoding HPRT correct biochemical abnormalities of HPRT-deficient cells and allow their survival in negative selection medium. *Metab Brain Dis.* 1999;14:205–21.
21. Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ, et al. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: Implications for clinical trials. *Nat Med.* 1999;5:1256–63.
22. Gerdes CA, Castro MG, Lowenstein PR. Strong promoters are the key to highly efficient, noninflammatory and noncytotoxic adenoviral-mediated transgene delivery into the brain in vivo. *Mol Ther.* 2000;2:330–8.
23. Curtin JF, Candolfi M, Xiong W, Lowenstein PR, Castro MG. Turning the gene tap off; implications of regulating gene expression for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:439–48.
24. Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, Leong KW. Radioresponsive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene therapy for malignant brain tumors. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:706–16.
25. Yamini B, Yu X, Gillespie GY, Kufe DW, Weichselbaum RR. Transcriptional targeting of adenovirally delivered tumor necrosis factor alpha by temozolomide in experimental glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64:6381–4.
26. Maatta AM, Samaranayake H, Pikkariainen J, Wirth T, Yla-Herttuala S. Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Curr Gene Ther.* 2009;9:356–67.
27. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 1986;46:5276–81.
28. 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.
29. Xiao J, Zhang G, Qiu P, Liu X, Wu Y, Du B, et al. Tanshinone IIA increases the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy via enhanced gap junctional intercellular communication. *PLoS One.* 2013;8:e67662.
30. Matono S, Tanaka T, Sueyoshi S, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Bystander effect in suicide gene therapy is directly proportional to the degree of gap junctional intercellular communication in esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2003;23:1309–15.
31. Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Ekstrom TJ, Almqvist PM. Histone deacetylase inhibitor 4-phenylbutyrate modulates glial fibrillary acidic protein and connexin 43 expression, and enhances gap-junction communication, in human glioblastoma cells. *Eur J Cancer.* 2004;40:1073–81.
32. Ammerpohl O, Thormeyer D, Khan Z, Appelskog IB, Gojkovic Z, Almqvist PM, et al. HDACi phenylbutyrate increases bystander killing of HSV-tk transfected glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:8–14.
33. Marconi P, Tamura M, Moriuchi S, Krisky DM, Niranjan A, Goins WF, et al. Connexin 43-enhanced suicide gene therapy using herpesviral vectors. *Mol Ther.* 2000;1:71–81.
34. Candolfi M, Curtin JF, Xiong WD, Kroeger KM, Liu C, Rentsendorj A, et al. Effective high-capacity gutless adenoviral vectors mediate transgene expression in human glioma cells. *Mol Ther.* 2006;14:371–81.
35. Candolfi M, Kroeger KM, Pluhar GE, Bergeron J, Puntel M, Curtin JF, et al. Adenoviral-mediated gene transfer into the canine brain in vivo. *Neurosurgery.* 2007;60:167–77 [discussion 78].
36. Candolfi M, Pluhar GE, Kroeger K, Puntel M, Curtin J, Barcia C, et al. Optimization of adenoviral vector-mediated transgene expression in the canine brain in vivo, and in canine glioma cells in vitro. *Neuro Oncol.* 2007;9:245–58.
37. Ali S, King GD, Curtin JF, Candolfi M, Xiong W, Liu C, et al. Combined immunostimulation and conditional cytotoxic gene therapy provide long-term survival in a large glioma model. *Cancer Res.* 2005;65:7194–204.
38. Candolfi M, King GD, Yagiz K, Curtin JF, Mineharu Y, Muhammad AK, et al. Plasmacytoid dendritic cells in the tumor microenvironment: Immune targets for glioma therapeutics. *Neoplasia.* 2012;14:757–70.
39. Ghulam Muhammad AK, Candolfi M, King GD, Yagiz K, Foulad D, Mineharu Y, et al. Antiglioma immunological memory in response to conditional cytotoxic/immune-stimulatory gene therapy: Humoral and cellular immunity lead to tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6113–27.
40. Westphal M, Yla-Herttuala S, Martin J, Warnke P, Menei P, Eckland D, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): A

- randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14:823-33.
41. Kokoris MS, Black ME. Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity. *Protein Sci.* 2002;11:2267-72.
 42. Black ME, Kokoris MS, Sabo P. Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Cancer Res.* 2001;61:3022-6.
 43. Khan Z, Knecht W, Willer M, Rozpedowska E, Kristoffersen P, Clausen AR, et al. Plant thymidine kinase 1: A novel efficient suicide gene for malignant glioma therapy. *Neuro Oncol.* 2010;12:549-58.
 44. Mutahir Z, Larsen NB, Christiansen LS, Andersson KM, Rico R, Wisen SM, et al. Characterization of oligomeric and kinetic properties of tomato thymidine kinase 1 nucleosides. *Nucleotides Nucleic Acids.* 2011;30:1223-6.
 45. Candolfi M, Kroeger KM, Muhammad AK, Yagiz K, Farrokhi C, Pechnick RN, et al. Gene therapy for brain cancer: Combination therapies provide enhanced efficacy and safety. *Curr Gene Ther.* 2009;9:409-21.
 46. Mineharu Y, Muhammad AK, Yagiz K, Candolfi M, Kroeger KM, Xiong W, et al. Gene therapy-mediated reprogramming tumor infiltrating T cells using IL-2 and inhibiting NF-kappaB signaling improves the efficacy of immunotherapy in a brain cancer model. *Neurotherapeutics.* 2012;9:827-43.
 47. Mineharu Y, Castro MG, Lowenstein PR, Sakai N, Miyamoto S. Dendritic cell-based immunotherapy for glioma: Multiple regimens and implications in clinical trials. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2013;53:741-54.
 48. Reardon DA, Wucherpfennig KW, Freeman G, Wu CJ, Chiocca EA, Wen PY, et al. An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12:597-615.
 49. Valerie K, Brust D, Farnsworth J, Amir C, Taher MM, Hershey C, et al. Improved radiosensitization of rat glioma cells with adenovirus-expressed mutant herpes simplex virus-thymidine kinase in combination with acyclovir. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:879-84.
 50. Rainov NG, Fels C, Droege JW, Schafer C, Kramm CM, Chou TC. Temozolomide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma. *Cancer Gene Ther.* 2001;8:662-8.
 51. Kim SH, Kim JH, Kolozsvary A, Brown SL, Freytag SO. Preferential radiosensitization of 9L glioma cells transduced with HSV-tk gene by acyclovir. *J Neurooncol.* 1997;33:189-94.
 52. Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar LK, Chakravarti A, Muzikansky A, et al. The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J Neurooncol.* 2004;67(1-2):177-88.
 53. Chiocca EA, Aguilar LK, Bell SD, Kaur B, Hardcastle J, Cavaliere R, et al. Phase IB study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy adjuvant to up-front surgery and intensive timing radiation for malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2011;29:3611-9.
 54. Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, et al. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2000;11:2197-205.
 55. Immonen A, Vapalahti M, Tynnela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, et al. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: A randomised, controlled study. *Mol Ther.* 2004;10:967-72.
 56. Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist.* 2002;7:46-59.
 57. Russell SJ. Replicating vectors for cancer therapy: A question of strategy. *Semin Cancer Biol.* 1994;5:437-43.
 58. Nanda D, Vogels R, Havenga M, Avezaat CJ, Bout A, Smitt PS. Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res.* 2001;61:8743-50.
 59. Weaver EA, Nehete PN, Buchl SS, Senac JS, Palmer D, Ng P, et al. Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccines. *PLoS One.* 2009;4:e5059.
 60. Heise C, Kirm DH. Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest.* 2000;105:847-51.
 61. Balani P, Boulaire J, Zhao Y, Zeng J, Lin J, Wang S. High mobility group box2 promoter-controlled suicide gene expression enables targeted glioblastoma treatment. *Mol Ther.* 2009;17:1003-11.
 62. Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA, Rivera AA, Mathis JM, Lesniak MS. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells.* 2008;26:831-41.
 63. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Kyritsis AP. The functional role of tumor suppressor genes in gliomas: Clues for future therapeutic strategies. *Neurology.* 1998;51:1250-5.
 64. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000;19:2-12.
 65. Gomez-Manzano C, Yung WK, Alemany R, Fueyo J. Genetically modified adenoviruses against gliomas: From bench to bedside. *Neurology.* 2004;63:418-26.
 66. Harada JN, Berk AJ. p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol.* 1999;73:5333-44.
 67. O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 2004;6:611-23.
 68. Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds PN, Curiel DT, Alemany R. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res.* 2001;7:120-6.
 69. Lamfers ML, Idema S, Bosscher L, Heukelom S, Moeniralm S, van der Meulen-Muileman IH, et al. Differential effects of combined Ad5- delta 24RGD and radiation therapy in in vitro versus in vivo models of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:7451-8.
 70. Hemminki O, Bauerschmitz G, Hemmi S, Lavilla-Alonso S, Diaconu I, Guse K, et al. Oncolytic adenovirus based on serotype 3. *Cancer Gene Ther.* 2011;18:288-96.
 71. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7:141-8.
 72. Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, Louis DN, Hochberg FH, Barker F, et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther.* 2004;10:958-66.
 73. Russell SJ, Peng KW. Measles virus for cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;330:213-41.
 74. Phuong LK, Allen C, Peng KW, Giannini C, Greiner S, TenEyck CJ, et al. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63:2462-9.