

# Diferencia de efectos de la terapia génica en tumores ortotópicos y heterotópicos □

Augusto Rojas Martínez,\* Estuardo Aguilar Córdova Córdova,\*\* Hugo A. Barrera Saldaña\*



En la actualidad se está explorando la administración de genes utilizando vectores virales para producir un efecto tóxico tumoricida en el tratamiento de tumores primarios y diseminados. Entre las estrategias de terapia génica para el cáncer, el esquema que usa el gen de la timidina quinasa del virus herpes simplex (HSV-*tk*), seguido por el tratamiento con ganciclovir (GCV), ha sido exitoso en el tratamiento de tumores en modelos animales que son refractarios a las modalidades terapéuticas convencionales en el ser humano.<sup>1,2</sup> Esta estrategia se basa en la conversión del análogo nucleosídico GCV en su intermediario activo, el GCV monofosfato, en las células transducidas con el gen HSV-*tk*. La pro-droga fosforilada provoca la muerte celular mediante el bloqueo de la síntesis de DNA (3). Adicionalmente, las células tumorales no transducidas también pueden afectarse cuando importan el producto GCV activo a partir de las células tumorales transducidas (efecto testigo)<sup>4</sup> o mediante la estimulación del sistema inmune en respuesta a las células.<sup>5,6</sup> Debido a que la efectividad terapéutica de este esquema depende de varios mecanismos, éste puede ser particularmente susceptible a las perturbaciones del microambiente tumoral.

Se han utilizado varios modelos animales para evaluar la efectividad de la terapia con el esquema HSV-*tk*/GCV. La implantación subcutánea de tumo-

res de próstata<sup>7</sup> y mesotelioma<sup>8</sup> son ejemplos de modelos heterotópicos. La implantación quirúrgica de células de glioblastoma en el cerebro (9) y la inducción química (10) o transgénica (11) de cáncer mamario en las células de esta glándula son ejemplos de modelos ortotópicos. La elección del modelo a utilizar se ha basado primordialmente en factores como disponibilidad y conveniencia, y aquellos experimentos exitosos en los modelos heterotópicos y ortotópicos han servido de base para la implementación de estudios clínicos. Sin embargo, el microambiente tumoral del modelo preclínico podría afectar significativamente el valor pronóstico para un resultado clínico.

Entre los factores microambientales que pueden influir en el resultado terapéutico están: la arquitectura del estroma, la respuesta local del tejido, el patrón de vascularización y la vigilancia inmunológica anti-tumoral. El propósito del presente estudio fue comparar la eficacia de la estrategia HSV-*tk*+GCV en microambientes ortotópicos y heterotópicos, usando un modelo de cáncer de mama.

## Materiales y métodos

*Células tumorales:* La línea celular de tumor mamario de ratón TM40D fue derivada de células mamarias FSK transplantadas en las almohadillas mamarias de ratonas singénicas de la cepa BALB/c (12). Las células fueron mantenidas en medio  $\alpha$ -MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con suero bovino de ternera al 10% y mantenidas a 37°C en una atmósfera aérea con CO<sub>2</sub> al 5%.

□ El presente artículo está basado en la investigación «Efectos diferenciales de la terapia génica con el sistema HSV-*tk* en tumores mamarios ortotópicos y heterotópicos» galardonado con el Premio de Investigación UANL 2000 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2001.

\*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.  
\*\* Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine.

Las células para inyección en las ratonas fueron cosechadas de cultivos de monocapa mediante un tratamiento con tripsina al 0.25% (Life Technologies, Gaithersburg, MD), lavadas una vez y resuspendidas en solución PBS para la inyección.

*Vectores adenovirales.* El vector AdV-RSV-*tk* contiene el gen timidina quinasa de HSV-1 (HSV-*tk*) dirigido por la repetición larga terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV) en un esqueleto genómico derivado del adenovirus humano tipo 5 (2). El vector utilizado en el grupo control (AdV-CMV- $\beta$ -gal) tiene el mismo esqueleto vectorial, pero el gen HSV-*tk* ha sido reemplazado por el gen lac-Z de *E. coli* dirigido por el promotor inmediato temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMVIE). Los vectores fueron producidos y cuantificados en el Gene Vector Laboratory del Baylor College of Medicine, como se ha reportado previamente (13).

*Implantación ortotópica y heterotópica de los tumores.* Se utilizaron ratonas de 5-6 semanas de la cepa BALB/c (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN) para generar los tumores ortotópicos y heterotópicos. Para los tumores ortotópicos ( $n=78$ ), las ratonas fueron sometidas a anestesia general con pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Chicago, IL) a 50 mg/kg. Para exponer la almohadilla mamaria número 4 izquierda (glándula mamaria), se realizó una incisión abdominal paramedial derecha, seguida por una incisión inguinal izquierda. La glándula mamaria se inyectó con  $5 \times 10^4$  TM40D células usando un volumen de inyección de 20  $\mu$ l como se ha reportado previamente (14). Los tumores heterotópicos ( $n=38$ ) fueron implantados subcutáneamente en el flanco derecho, utilizando  $5 \times 10^4$  células resuspendidas en 50  $\mu$ l.

*Administración del vector y tratamiento con GCV.* Los vectores AdV-RSV-*tk*, AdV-CMV- $\beta$ -gal y la solución salina de fosfatos fueron inoculados en el interior del tumor mediante inyección directa (20  $\mu$ l), en tumores de 40 mm<sup>3</sup> de volumen aproximadamente. El GCV se administró mediante inyección intraperitoneal a 20 mg/kg, dos veces al día durante seis días, usando un volumen de inyección de 100  $\mu$ l.

*Análisis de los datos.* Se calculó el tamaño de cada tumor cada cuatro días, determinando el promedio de los diámetros mayor y menor de cada tumor. Los

animales se sacrificaron cuando se alcanzaba un diámetro de 2.5 cm, o cuando los animales estaban visiblemente enfermos. El promedio del diámetro del tumor en cada observación se comparó con el promedio obtenido al momento de la transducción con el vector para determinar su índice de crecimiento relativo (ICR). Para los estudios de eficacia antineoplásica, se promediaron los ICR de cada grupo en cada punto de observación y al valor obtenido se le restó 1 para obtener la proporción neta de crecimiento tumoral (PNCT). Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba *t* de Student para comparar los resultados obtenidos en el grupo de tratamiento y en el grupo control. La densidad tumoral, vascularidad, necrosis/apoptosis y la respuesta inmune fueron analizadas de forma ciega por un patólogo que desconocía a qué grupo pertenecían los tumores que analizaba.

## Resultados y discusión

*Comparación del crecimiento tumoral después de las implantaciones ortotópicas y heterotópicas.* Las tasas de crecimiento de los tumores en ambas localizaciones fueron constantes durante el periodo de observación. Los tumores ortotópicos crecieron 1.24 veces más rápido que los tumores heterotópicos. (figura 1 A).

Los tumores ortotópicos exhibieron celularidad tumoral incrementada en comparación con las masas heterotópicas (figuras 2A y B). En los tumores ortotópicos, se observó necrosis focal acompañada por hemorragia, sugiriendo la presencia de zonas de isquemia focal probablemente debidas al rápido crecimiento de la neoplasia (figura 2A). La masa tumoral periférica viable era densa y carecía de un infiltrado celular inflamatorio significativo. Inclusive se observó pobre respuesta inflamatoria en nódulos linfáticos mamaros ocasionales rodeados de tumor en expansión, la cual se evidenciaba por el mínimo número de centros germinales documentado en estos nódulos (figura 2C). Estos tumores estimulaban la neovascularización. Se observaron vasos de tamaño moderado (50-100  $\mu$ m) en los márgenes tumorales (figura 2C) con numerosos capilares infiltrando el tejido maligno.

En contraste, los tumores subcutáneos mostraron necrosis más extensa en las áreas periféricas de la neoplasia. Se observaron numerosos linfocitos infiltrantes y grupos de células plasmáticas presentes

en el margen viable del tumor (figuras 2B y D). Adicionalmente, estos tumores fueron menos densos y presentaban pocos vasos de tamaño moderado, principalmente en la periferia de la masa. Estos datos indican que el acceso de la vasculatura, el mecanismo de necrosis y la respuesta inmune son diferentes en las dos localizaciones.

Es probable que el microambiente también haya afectado otros parámetros que son importantes para la respuesta biológica de la terapia. Aún en regímenes terapéuticos sistémicos, como la quimioterapia, se han observado diferencias relacionadas al sitio de implantación del tumor. Por ejemplo, se ha reportado una respuesta disminuida a la ciclofosfámina en tumores murinos generados en el espacio subcutáneo en comparación con la respuesta observada en metástasis pulmonares (15). De manera similar, se observó que el tratamiento sistémico con ácido flavono-acético era más efectivo en tumores diseminados de adenocarcinoma de colon que en implantes subcutáneos (16). La terapia génica difiere de la quimioterapia en la posibilidad de administrar el agente terapéutico directamente en el interior de la masa tumoral, ejerciendo un mayor efecto local. Considerando esta diferencia, la selección del modelo tumoral apropiado puede ser aun más relevante para una correlación más apropiada con el resultado terapéutico. De acuerdo a lo anterior, el desarrollo de modelos preclínicos para terapia génica implica que, además del tipo celular seleccionado, también se debe considerar el sitio de implantación en el modelo *in-vivo*.

*Eficacia de la terapia HSV-tk+GCV en los tumores ortotópicos y heterotópicos.* El tratamiento de los tumores ortotópicos con HSV-tk y GCV resultó en una reducción significativa de la tasa de crecimiento tumoral (33.1% al día 8). Después de concluir el tratamiento con GCV, las masas neoplásicas tratadas reasumieron su velocidad de crecimiento y para el día 20 post-transducción, estos tumores alcanzaron el tamaño aproximado de los tumores del grupo control, no lográndose un beneficio terapéutico más prolongado (figura 1B). En el modelo heterotópico no se observó inhibición del crecimiento tumoral hasta que se completó el tratamiento con GCV (día 8). La máxima supresión de la tasa de crecimiento en este modelo se alcanzó al día 12 (39.4%) y aunque los tumores continuaron creciendo, el tamaño de las neoplasias permaneció siendo

significativamente inferior a la observada en los controles durante todo el periodo de observación. Aunque la sobrevida postterapéutica en el modelo heterotópico fue mayor ( $TD_{50}$  39) que en la contraparte ortotópica ( $TD_{50}$  29), ninguno de los grupos alcanzó una diferencia significativa en comparación con sus controles respectivos (datos no mostrados).

Las bases para las diferencias en la respuesta terapéutica en los dos sitios estudiados está probablemente relacionada con los mecanismos de acción de la terapia. Se han propuesto tres mecanismos de acción para la terapia HSV-tk/GCV: 1) la inhibición directa de la síntesis de DNA, 2) el efecto testigo y 3) la activación del sistema inmune. Es muy probable que varios factores del microambiente afecten la eficacia de estos mecanismos.

Por ejemplo, el sitio de implantación afecta la arquitectura celular, la vascularización y la velocidad de crecimiento de la neoplasia. A su vez, la arquitectura tumoral puede afectar la distribución del vector y el efecto testigo. La vascularización afecta la disponibilidad del medicamento y la respuesta inmune del huésped. La velocidad de crecimiento afecta la síntesis de DNA y de esta misma manera, afecta la citotoxicidad del análogo nucleotídico.

## Conclusión

En este reporte se demuestran las diferencias en velocidad de crecimiento, morfología, respuesta inmune y efecto de la terapia HSV-tk/GCV en modelos ortotópicos y heterotópicos de tumores mamarios. Los resultados subrayan la importancia de utilizar modelos sitio-específicos de cáncer, apropiados para examinar la eficacia de las modalidades de terapia génica.

## Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo científico y metodológico recibido para la realización de este trabajo por parte del Dr. Estuardo Aguilar Córdova y del Dr. Kerby Oberg y la asistencia técnica de la Sra. Francis S. Kittrell. ARM fue auspiciado por el programa de Cátedras Patrimoniales II del CONACYT.

## Resumen

Se analizaron los efectos de la terapia génica en dos microambientes, comparando las respuestas en

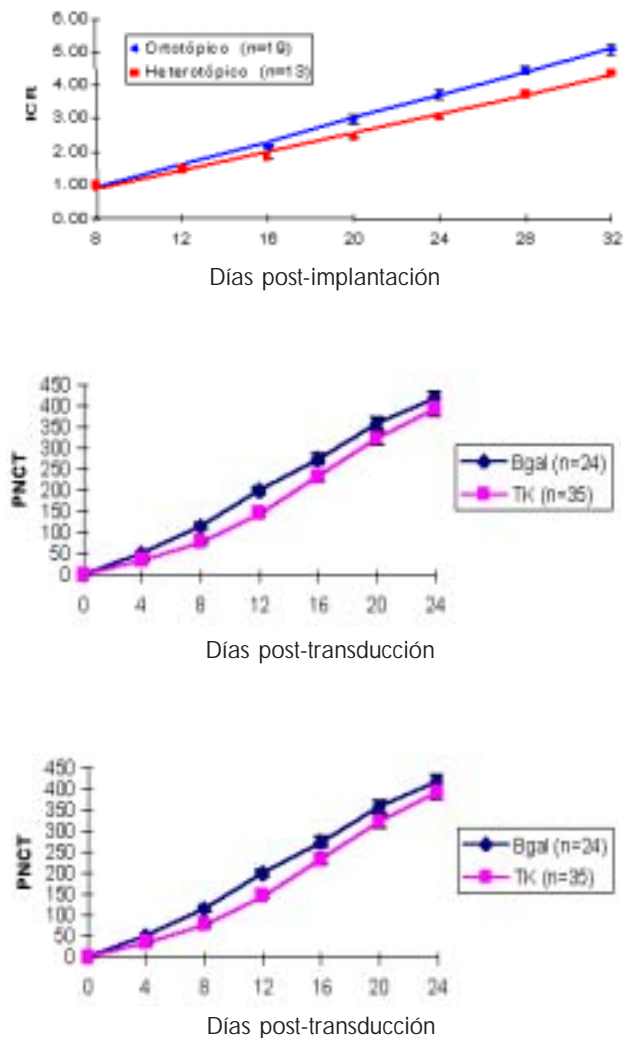


Fig. 1. Crecimiento de los tumores TM40D en los modelos ortotópico y heterotópico. A) Comparación de las tasas de crecimiento de los tumores TM40D en ausencia de tratamiento: La grafica representa el crecimiento de los tumores a partir del día 8 post-implantación. Los tumores ortotópicos (diamantes), mostraron un crecimiento significativamente más acelerado que los heterotópicos (cuadros). B) Efecto de HSV-tk/GCV en el modelo ortotópico: La supresión del crecimiento tumoral fue evidente y significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) en el grupo de tratamiento (cuadros) durante los 16 días posteriores a la inyección del vector terapéutico. Después de este periodo, la diferencias de tamaño entre los tumores tratados y los del grupo control dejó de ser significativa. C) Efecto de HSV-tk/GCV en el modelo heterotópico: La supresión del crecimiento tumoral en el grupo terapéutico (cuadros) sólo fue evidente después del día 8 post-transducción. Después de este punto, el crecimiento tumoral fue reducido en comparación con el del control ( $p < 0.05$ ). ICR: indice de crecimiento relativo. PNCT: proporción neta de crecimiento tumoral.

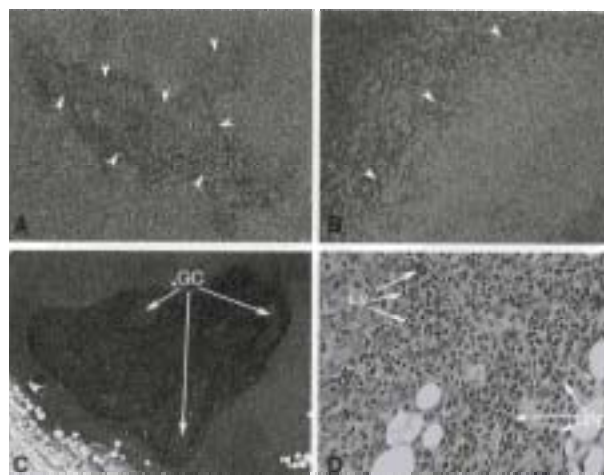


Fig. 2. Comparación histopatológica de la necrosis, la vascularidad y la respuesta inmune en los tumores ortotópicos y heterotópicos tratados con el sistema *HSV-tk/GCV*: Los tumores ortotópicos muestran lesiones de necrosis focal (A), mientras que los tumores heterotópicos (B) muestran un patrón de necrosis periférica extensa acompañada de infiltración de linfocitos y células plasmáticas (D). Aunque en el modelo ortotópico, algunos nódulos linfoides mamarios fueron invadidos por el crecimiento tumoral (C), la activación de linfocitos no es evidente, como lo demuestra la presencia de escasos centros germinales. A, B y C: Magnificación 60X. D: magnificación 250X. Las flechas blancas señalan los bordes de necrosis. GC: Centros germinales, PC: Células plasmáticas, Ly: Linfocitos.

tumores mamarios generados con células TM40D en el espacio subcutáneo (modelo heterotópico) y en la glándula mamaria (modelo ortotópico) en ratonas singénicas. Se estudiaron tres grupos: 1) Tratamiento experimental (*HSV-tk/GCV*), 2) Control adenoviral y 3) Placebo. El tratamiento logró una supresión tumoral transitoria en ambos modelos, pero esta supresión fue significativamente diferente en cada microambiente y los tumores mostraron distintos patrones de necrosis, vascularidad y respuesta inmune. Los datos indican que el microambiente puede afectar la eficacia de la terapia génica.

**Palabras clave:** Terapia génica del cáncer, Carcinoma mamario, Modelos animal, Ensayos clínicos.

### Abstract

The microenvironment effects on tumor responsiveness to gene therapy were analyzed by comparing TM40D mammary tumor cells implanted

into syngeneic mice subcutaneously (heterotopic model) or into the mammary gland (orthotopic model). Three groups were analyzed: 1) Experimental treatment (HSV-*tk*/GCV), 2) adenoviral control and 3) mock groups. Treatment resulted in transient tumor growth suppression in both models, but tumor growth rate and responsiveness to therapy were significantly different and tumors displayed different patterns of necrosis, vascularity and immune response. Data indicates that tumor microenvironment may impact the efficacy of gene therapy.

**Keywords:** Cancer gene therapy, Mammary carcinoma, Animal models, Clinical trials.

## Bibliografía

- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In-vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*. 1992; 256:1550-1552.
- Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in-vivo*. *Proc Natl Acad USA*. 1994; 91:3054-3057.
- Reid R, Mar EC, Huang ES, Topal MD. Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine triphosphate. *J Biol Chem*. 1988; 263:3898-3904.
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koepf DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res*. 1993; 53:5274-5283.
- Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:4348-4352.
- Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther*. 1997; 4: 91-96.
- Eastham JA, Chen SH, Sehgal I, Yang G, Timme TL, Hall SJ, Woo SL, Thompson TC. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Hum Gene Ther*. 1996; 7:515-523.
- Smythe WR, Hwang HC, Elshami AA, Amin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM. Treatment of experimental human mesothelioma using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene. *Ann Surg*. 1995; 222:78-86.
- Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH. In situ retroviral mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res*. 1993; 53:83-88.
- Wei MX, Bougnoux P, Sacre-Salem B, Peyrat MB, Lhuillery C, Salzmann JL, Klatzmann D. Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. *Cancer Res*. 1998; 58:3529-3532.
- Sacco MG, Benedetti S, Dufrot-Dancer A, Mesnil M, Aranda S, Vezzoni P, Finocchiaro G. Partial regression, yet incomplete eradication of mammary tumors in transgenic mice by retrovirally mediated HSV-*tk* transfer "*in-vivo*". *Gene Ther*. 1996; 3:1151-1156.
- Kittrell FS, Oborn CJ, Medina D. Development of mammary preneoplasias *in-vivo* from mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Cancer Res*. 1992; 52:1924-1932.
- Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med*. 1997; 3:808-811.
- Cardiff RD, Aguilar-Cordova E. Proto-neoplasia revisited: the molecular biology of mouse mammary hyperplasia. *Anticancer Res*. 1988; 8:925-33.
- Smith KA, Begg AC, Denekamp J. Differences in chemosensitivity between subcutaneous and pulmonary tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1985; 21:249-256.
- Bibby MC, Phillips RM, Double JA. Influence of site on the chemosensitivity of transplantable murine colon tumors to flavone acetic acid. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989; 24:87-94.