

EFEECTO DE LA PREINMUNIZACIÓN SOBRE LA EFICACIA TERAPÉUTICA Y TOXICIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL

ANDRÉS HERNÁNDEZ GARCÍA^{*,**}, MARÍA T. VLACHAKI^{**}, MICHAEL ITTMANN^{**,**}
HUGO A. BARRERA SALDAÑA^{*}, ESTUARDO AGUILAR CORDOVA^{****}



Los adenovirus recombinantes de origen humano se utilizan ampliamente en protocolos de terapia génica, tanto en modelos preclínicos como en estudios clínicos en fase I. Su explosiva utilización se debe, en parte, a que los vectores adenovirales de primera generación exhiben una notable y prolongada estabilidad biológica dentro del torrente circulatorio. Esta condición les permite funcionar como excelentes vehículos que transportan genes terapéuticos a varios órganos, diferentes tumores y a diversos tipos de células neoplásicas.

A pesar de esta ventaja biológica, existen dos importantes factores que han limitado que se explore el potencial de los vectores adenovirales en protocolos de terapia génica. El primer problema es su carencia de especificidad hacia un solo tipo de células huésped. En efecto, los adenovirus pueden infectar un amplio rango de líneas celulares, lo cual hace difícil restringir el transporte de genes terapéuticos por vía endovenosa hacia un determinado grupo de células o hasta un órgano en particular.^{1,2}

Una segunda desventaja, observada durante el uso de adenovirus en el tratamiento del cáncer, es el

desarrollo de una respuesta inmunológica en contra de las partículas virales dentro del paciente.^{3,4,5}

Durante un ciclo inicial de tratamiento, tales vectores pueden infectar un número apropiado de células y producir una alta expresión de la proteína deseada. Pero pronto las respuestas celular y humoral desarrolladas por el paciente interferirán con la expresión del gen terapéutico, y resultarán en la aparición de fenómenos de citotoxicidad.^{6,7,8,9}

Desde otra perspectiva, la presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus pudiera ejercer un efecto protector en los tejidos normales y reducir el riesgo de complicaciones, transformándose así en un factor de bioseguridad, ya que permitiría administrar dosis masivas de adenovirus por vía intratumoral, sin la diseminación consecuente del vector, garantizando una elevada expresión y persistencia de los genes terapéuticos.

Esta situación se torna especialmente importante después de la muerte de Jesse Gelsinger, afectado por una enfermedad metabólica conocida como deficiencia de Ornitin Transcarbamilasa (OTC). Jesse desarrolló un síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA) complicado con falla orgánica múlti-

□ El presente artículo está basado en la investigación «Efecto de pre-inmunización con vectores adenovirales sobre la efectividad terapéutica y la toxicidad de la terapia génica antitumoral», galardonado con el Premio de Investigación UANL 2002 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2003.

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la UANL, México.

** Veterans Affairs Medical Center, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030, USA.

*** Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030, USA.

**** Harvard Gene Therapy Initiative, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, 02115, USA.

ple (FOM), mientras participaba en un protocolo de terapia génica diseñado por la Universidad de Pennsylvania.¹⁰

El protocolo fase I en cuestión consistió en inocular una sola dosis (6×10^{11} partículas/Kg) de un adv-vector (H5.001CBhOTC) que expresa el ADN_c que codifica para la enzima OTC en la arteria hepática derecha del paciente.

Después de este reporte los Institutos Nacionales de Salud (NIH) revisaron los efectos adversos de los adenovirus en macacos, encontrando que todos los simios inoculados con este tipo de vectores desarrollaron fenómenos de hepatotoxicidad y se reportaron severamente enfermos, este hecho, aunado con el conocimiento de que los 18 pacientes pertenecientes al protocolo OTC de la Universidad de Pennsylvania presentaron titulaciones elevadas de anticuerpos neutralizantes en contra del vector H5.001CBhOTC,¹⁰ obligó a la Federal Drug Administration de EUA a suspender todos los estudios de terapia génica que se llevaban a cabo en dicha Universidad. El informe final de este organismo destacó que: Jesse Gelsinger sufrió una *activación difusa* de su sistema inmune tras la inyección del vector, como consecuencia de ello desarrolló los síndromes de SDRA y FOM.

En el presente trabajo, utilizamos un modelo murino preinmunizado a través de la inyección intratumoral (IT) de adenovirus, para investigar la posible participación del sistema inmune en la transferencia génica mediada por adv-vectores en el tratamiento de tumores sólidos. La preinmunización provocó un incremento en la titulación de anticuerpos antiadenovirus que ocasionó una disminución en los niveles de transferencia y expresión génica. Los aspectos de toxicidad sistémica fueron determinados por medio de estudios enzimáticos e histológicos. El establecimiento de una respuesta humoral contra adenovirus redujo significativamente la transducción sistémica con el vector. Sin embargo, dicha reducción no se tradujo en un efecto protector en los tejidos normales. Paradójicamente, la respuesta inmune montada en contra del vector resultó en un incremento de los parámetros de toxicidad hepática comparados con los observados en animales controles.

Resultados

Se analizaron los datos obtenidos entre los grupos de animales inmunizados por vía subcutánea e

intratumoral, y se compararon con aquellos obtenidos en los animales testigos. Los animales preinmunizados mostraron una titulación de anticuerpos tres veces más elevada que la reportada para animales controles. Asimismo, en los grupos de animales preinmunizados se observó una elevación en los títulos de anticuerpos muy similar entre las dos vías de inmunización. La misma tendencia fue observada al analizar los resultados del ensayo de neutralización (datos no mostrados, figura 1).

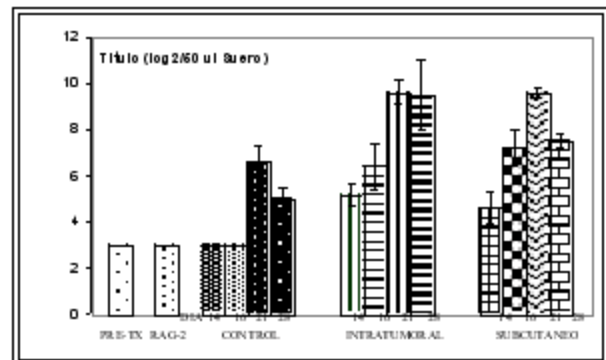


Fig. 1. El incremento en los títulos de anticuerpos es una función dependiente del tiempo. Nótese que en los animales controles hay una sobreproducción de anticuerpos después de siete días de la primera inmunización. En el grupo preinmunizado, después de la reinmunización con el segundo vector (día 14), se observa un mayor incremento en la producción de anticuerpos hacia el día 21, la actividad humoral comenzó a disminuir hacia el día 28.

En los animales controles inoculados con solución salina, la producción de anticuerpos fue similar a la exhibida por los ratones antes del tratamiento y a la de los ratones inmunodeficientes. Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre las titulaciones observadas en los cinco grupos de animales inoculados con dosis crecientes de adenovirus ($p > 0.19$, datos no mostrados). La misma tendencia fue observada al analizar los resultados del ensayo de neutralización (datos no mostrados).

La actividad del producto del gen marcador fue determinada como un indicador del nivel de transferencia y expresión génica a nivel local y sistémico. Dos días después de la inyección intratumoral (IT) del vector AdV-Luc a una dosis de 1×10^{11} partículas del vector (v.p.) /tumor, el promedio de actividad de luciferasa (Luc) dentro del tumor de los animales controles fue 23 veces más alto (23X), comparado con los ratones preinmunizados (3.07×10^8 RLU/gm contra 1.3×10^7 , respectivamente, $p = 0.004$). De

la misma manera, la expresión de Luc en el total de tejidos examinados fue significativamente más elevada en el grupo control, en comparación con los animales preinmunizados: 808 X para el hígado, 2,392 X para el bazo y 714 X para los ovarios. En el grupo de animales preinmunizados se apreció una significativa disminución en la actividad de luciferasa, la cual fue similar entre ambas rutas de inmunización (intratumoral y subcutánea, figura 2).

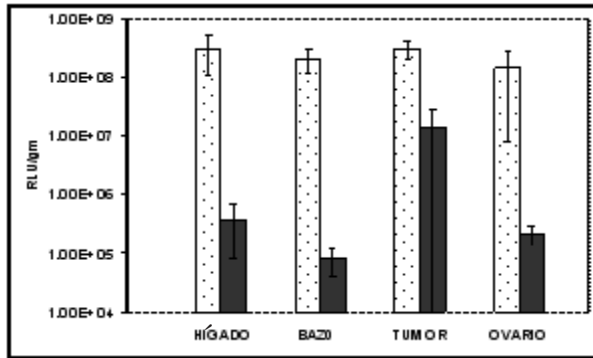


Fig. 2. Actividad de luciferasa expresada en RLU/g de tejido. Al día 16 postratamiento, el grupo de animales sin inmunidad preexistente exhiben un incremento en la actividad de Luc en cada uno de los órganos examinados. Dicha elevación es más acentuada en el hígado y dentro del parénquima tumoral ($3.00E+8$) que las observadas en el bazo y el ovario. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la expresión de Luc entre tumor, hígado, bazo y ovarios, lo cual indica la diseminación sistémica del vector. En los animales preinmunizados, la expresión de AdV-Luc, inyectado intratumoralmente, dentro del propio tumor, fue significativamente mayor que la observada en el hígado (33 X), bazo (131 X) y ovario (55 X).

La expresión de Luc fue evaluada como una función dependiente del tiempo (2, 7, y 14 días después de la inyección IT de AdV-Luc, $n=5$ animales/grupo) y resultó significativamente mayor en el grupo control, comparada con el grupo experimental, en todos los tiempos del estudio. Específicamente, la preinmunización provocó una notoria disminución en la expresión IT de AdV-Luc a los dos días después de iniciada la reinmunización (24 X, $p=0.004$). En todos los grupos de estudio la expresión de Luc fue significativamente mayor durante el día 2 después de la administración del vector. Contrariamente, durante los días 7 y 14 se observó una significativa disminución de la actividad IT de Luc en el rango de 54 X y 53 X, para el grupo control, y de 65 X y 337 X, para el grupo de animales preinmunizados, respectivamente ($p=0.001$, figura 3).

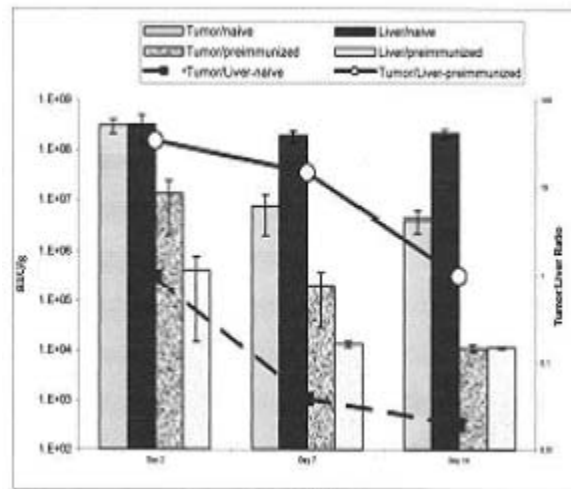


Fig 3. Expresión de Adv-Luc como una función del tiempo. El eje de la izquierda indica el nivel de luciferasa expresado en RLU/ gr. En el eje derecho se indica el cociente tumor-hígado. En los ratones controles la expresión de AdV-Luc dentro del hígado presentó mínimos cambios en el transcurso del tiempo. Inversamente, en los grupos de animales preinmunizados se observó una significativa disminución en la actividad de la enzima, al compararla con los animales controles 808 X durante el día 2 y por arriba de 10,000 X durante los días 7 y 14. Estos resultados se tradujeron en un significativo incremento del cociente tumor/hígado de los títulos de la actividad de luciferasa, en los animales preinmunizados en comparación con los animales controles en todos los tiempos de estudio.

La expresión de Luc fue evaluada como una función de la dosis de AdV-Luc administrada. La cuantificación de la enzima se efectuó dos días después de la administración del vector. Sorprendentemente, en los animales preinmunizados, el uso de dosis crecientes de AdV-Luc no incrementó la expresión de Luc a nivel hepático. Sin embargo, la actividad de la enzima a nivel IT fue directamente proporcional a la dosis del vector administrada.

En los animales controles se observó que al incrementar el rango de dosis de 2×10^9 a 6×10^9 p.v./tumor se produce un significativo incremento de 4000 X en los niveles de expresión de Luc en el hígado. Paradójicamente, la actividad de Luc dentro del tumor presentó un pequeño incremento que no reportó diferencias significativas (figura 4).

El segundo objetivo de este trabajo fue evaluar los aspectos de toxicidad sistémica. Como las dosis de 2×10^{11} p.v./tumor se encuentran por debajo del umbral de toxicidad, para iniciar el estudio de toxicidad utilizamos megadosis en el rango de 2×10^{11} y 6×10^{11} p.v./tumor equivalentes a 1×10^{13} y 3×10^{13} p.v./Kg. de peso corporal, respectivamente. En

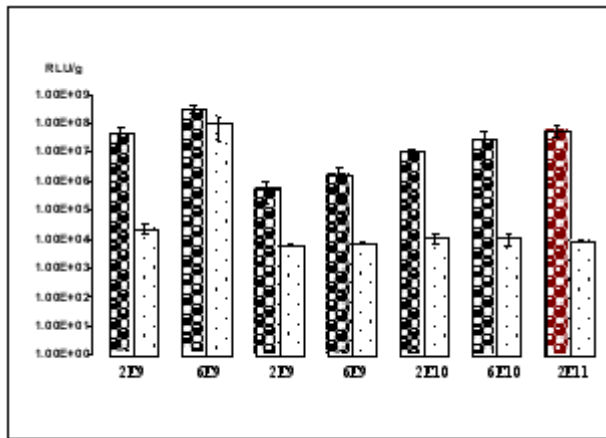


Fig. 4. Expresión de Adv-luciferasa en animales preinmunizados como una función dependiente de la dosis. El análisis de los resultados demostró una significativa disminución en la expresión intratumoral de Adv-Luc en los dos primeros grupos, los cuales recibieron las dosis más bajas (2×10^9 , 6×10^9). Al comparar estos resultados con los niveles de expresión reportados en los grupos que recibieron las dosificaciones más altas (2×10^{10} , 6×10^{10} , 2×10^{11}), se puede observar un incremento 30 veces mayor en la actividad de luciferasa en estos últimos grupos ($p < 0.042$). Notablemente, la expresión intratumoral de luciferasa en los tres grupos de más alta dosificación fue comparable con aquella observada en los animales controles ($p > 0.9$).

este rango de dosis, 12 de 20 (60%) animales preinmunizados murieron dentro de las primeras 12 horas después de la administración de Adv-Luc, en contraste con sólo dos muertes 3 de 20 (15%) observadas en el grupo sin inmunidad preexistente. Los animales sobrevivientes se sacrificaron a los tres días después de la inyección del vector, y se realizó evaluación histológica en cada uno de los órganos en estudio por un patólogo que desconocía el origen de los especímenes en estudio. Los cambios histológicos fueron clasificados de acuerdo a una escala de 0 correspondiente a una morfología normal y de 1 a 4, para definir los cambios que se ubican desde una inflamación diseminada hasta la necrosis severa (figura 5).

Diseño experimental

En la parte final del estudio se analizaron los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa, (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en el plasma de los animales en estudio, a los tres días después de la inyección IT del vector. Observándose un incre-

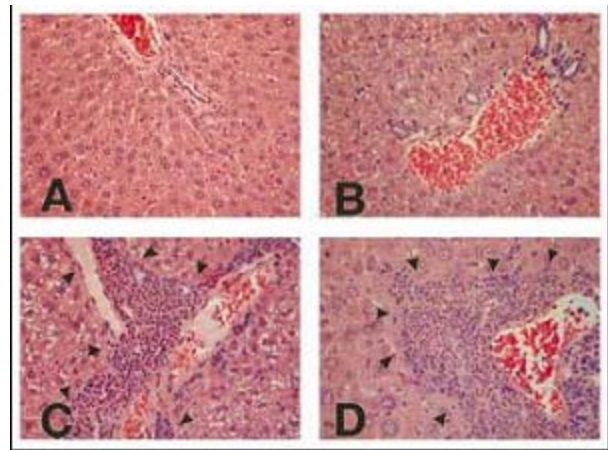


Fig. 5. Hallazgos histológicos después de la inyección de Adv-Luc. La imagen histológica de un lobulillo hepático normal es ilustrada en (A), mientras que en (B) se presenta un área similar correspondiente a un animal sin inmunidad preexistente e inoculado con Adv-Luc. Las flechas muestran los cambios observados en los animales preinmunizados caracterizados por un infiltrado linfóide multifocal constituido por células mononucleares y neutrófilos, alrededor de las triadas portales (C) y las venas centrales (D).

mento significativo en el suero de los animales preinmunizados comparado con el de los controles ($p = 0.05$, tabla I).

Discusión

El tropismo natural que los adenovirus presentan hacia el hígado y pulmón, así como las facilidades técnicas para inyectar algunos tipos de tumores sólidos, los coloca como atractivos candidatos para el

Tabla I. Enzimas hepáticas después de la inyección intratumoral de adenovirus en ratones controles y preinmunizados

| Grupo de animales normal | Dosis de Vector | ALT | AST |
|--------------------------|--------------------|---------------|----------------|
| | NONE | 42.03 ± 27.53 | 86.47 ± 35.27 |
| Controles | 2×10^{11} | 50.78 ± 58.28 | 211.0 ± 53.57 |
| Controles | 6×10^{11} | 43.25 ± 41.99 | 170.6 ± 117.8 |
| Inmunizados | 2×10^{11} | 224.0 ± 181.4 | 381.0 ± 177.2 |
| Inmunizados | 6×10^{11} | 193.5 ± 161.1 | 394.2 ± 186.34 |

*Promedios obtenidos de tres cepas diferentes de ratones. Los valores correspondientes a la cepa Balbc/c no se encuentran disponibles.

tratamiento de pneumopatías, enfermedades hepáticas y en el tratamiento del cáncer.

Sin embargo, el entusiasmo inicialmente desencadenado con el uso de vectores adenovirales, se ha visto disminuido a causa de la inestabilidad del transgen, atribuida a los mecanismos de respuesta inmune generados en contra de las células que expresan los productos transgénicos de origen viral.

Las consecuencias de la inmunidad preexistente contra adenovirus son de particular interés, debido a que una gran mayoría de los seres humanos han estado expuestos a infecciones por adenovirus, y han desarrollado anticuerpos neutralizantes en su torrente circulatorio y en la mucosa de las vías aéreas. Como estos vectores son comúnmente utilizados en protocolos de terapia génica *in vivo*, es lógico suponer que este tipo de inmunidad protectora puede ocasionar serios problemas de citotoxicidad a nivel hepático, por lo tanto, la preinmunización contra adenovirus surge como un serio factor limitante en la selección de un protocolo de terapia génica basado en la administración de vectores advirales.^{9,11}

La inmunogenicidad de los vectores adenovirales se ve exacerbada por el uso de dosis repetidas del vector; lo cual puede ocasionar una reactivación de la respuesta inmune, incrementándose así el riesgo de citotoxicidad. Sin embargo, algunos estudios preclínicos han demostrado que la administración repetida de adv-vectores puede inhibir el desarrollo tumoral,^{12,13} por lo que la administración de inyecciones intratumorales múltiples se ha utilizado en algunos ensayos clínicos en fase I-II.^{14,15} A la luz de esta evidencia, el conocer las consecuencias de la inmunidad preexistente puede tener enormes implicaciones en el estudio, diseño y resultados de la terapia génica contra el cáncer basada en el uso de vectores adenovirales.

Los aspectos de distribución, cinética, toxicidad, transferencia y expresión genética de los vectores adenovirales fueron evaluados midiendo la actividad de luciferasa dentro del tumor y en diferentes órganos, como una función dependiente del tiempo y de la dosis del vector administrada. Los títulos de anticuerpos no se vieron afectados por el incremento de las dosis utilizadas durante la preinmunización. Sin embargo, la inyección IT de dosis crecientes de Adv-Luc en ratones no inmunizados se tradujo en una significativa elevación de los valores de Luc a nivel periférico, y un discreto incremento en la expresión a nivel IT. Dicha observación sugiere una diseminación sistémica del vector a consecuencia de una

saturación local de los receptores membranales de partículas virales. En contraste, en los animales preinmunizados (con títulos elevados de anticuerpos) el incremento en la dosis IT del vector fue directamente proporcional con el incremento de la actividad de luciferasa dentro del tumor, pero los niveles de expresión a nivel periférico fueron bajos, y no se observó ningún incremento a nivel hepático, fundamentando la idea de una posible inhibición de la transducción periférica a causa de la presencia de anticuerpos neutralizantes.

Debido a que la disminución de la expresión de Luc fue mucho más pronunciada a nivel periférico que a nivel IT, nosotros y otros autores hemos hipotetizado que la disminución en la eficiencia de la transducción tumoral a causa del desarrollo de una respuesta inmune, puede ser corregida incrementando la dosis del vector.^{15,16} Nuestros resultados demuestran que la utilización de megadosis de Adv-Luc (6×10^{10} a 2×10^{11} p.v), en ratones preinmunizados, restituye los niveles de expresión intratumoral sin incrementar el nivel de expresión a nivel hepático. Esta aparente inmunoprotección parece sustentar las observaciones de Branson y Graham,¹⁶ quienes reportaron que en ratones preinmunizados por vía intranasal, y que luego recibieron una inyección IT con un vector que expresa IL-12, se observó una discreta disminución de 2.4X de la transducción tumoral acompañada con una importante disminución (1000X) en la expresión del transgen a nivel hepático. Estos autores sugieren que la inmunidad preexistente pudiera ser ventajosa, ya que no bloquea por completo la transducción tumoral, pero sí reduce significativamente la diseminación sistémica de los adenovirus. Además, concluyen que en aquellos protocolos de terapia génica, en los que se presentan fenómenos de toxicidad periférica, pudiera ser benéfico preinmunizar los pacientes y, posteriormente, repetir e incrementar la cantidad del inóculo, reinstalándose así los niveles de expresión.

Aunque nuestros resultados soportan la conclusión de que el uso de megadosis de adv-vectores garantiza un incremento en los niveles de expresión, la tan esperada citoprotección atribuida a la preinmunización fue sólo observada a nivel de la expresión local del transgen. Paradójicamente, nosotros observamos importantes hallazgos de citotoxicidad periférica.

La presentación de hepatitis en el grupo de ratones preinmunizados fue un fenómeno por completo inesperado, ya que nosotros habíamos hipotetizado

que la inmunidad humoral pudiera tener un efecto protector, en virtud de que algunos estudios preclínicos, incluido el nuestro, habían demostrado que la presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de adenovirus limitan la transferencia del vector hacia el parénquima hepático.¹⁷ En el presente estudio reportamos lo contrario, ya que en el grupo preinmunizado se observó una elevada mortalidad (60%) dentro de las primeras 18 horas después de la inyección y los estudios enzimáticos y anatomopatológicos evidenciaron la presencia de hepatitis. Estas alteraciones no fueron observadas en el grupo control.

La ausencia de hepatotoxicidad en los animales sin inmunidad preexistente fundamenta que la toxicidad no es una consecuencia directamente asociada con la inyección de partículas virales, y sugiere que esta complicación se debe al montaje de una respuesta inmune combinada con el uso de dosis masivas de adenovirus.

No obstante que los factores que transforman una respuesta inmunológica de protectora a citotóxica no fueron evaluados en este estudio, podemos especular que el rápido desarrollo de síntomas, así como su coincidencia con la presentación de anticuerpos, sugiere que una respuesta inmune humoral pudiera ser la responsable de esta cascada de eventos: inicialmente el complejo de viriones unidos con anticuerpos o con plaquetas ocasionaría el depósito de los mismos a nivel celular, provocando reacciones inflamatorias a través de la activación del sistema del complemento. Estos complejos inmunes originan también hepatotoxicidad y plaquetopenia en modelos murinos,^{18, 19} y la activación del complemento después de la infección con adenovirus ha sido demostrada en humanos.¹¹ Posteriormente, la activación del complemento puede conducir a la activación de citoquinas, factores transcripcionales o de señales de apoptosis que ocasionan una inflamación sistémica, diestrés respiratorio y falla orgánica múltiple que conlleva a la muerte del paciente.^{10, 11}

En conclusión: la existencia de inmunidad en contra de adenovirus antes de la administración intratumoral de vectores virales, puede obstaculizar la diseminación de los viriones desde el sitio de la inyección hacia el hígado y puede ser un factor protector cuando se usan dosis moderadas del vector. Sin embargo, cuando se administran dosis elevadas de partículas virales, se pueden presentar serios problemas de toxicidad hepática, que pueden oca-

sionar la muerte del paciente.

Los aspectos etiológicos de la hepatotoxicidad necesitan ser estudiados a profundidad a causa de las enormes implicaciones bioéticas que tienen en los protocolos de terapia génica. Es probable que la toxicidad se presente sólo cuando se utilizan dosis altas de adv-vectores, como las utilizadas en nuestro estudio. Esta suposición se sustenta en el hecho de que no observamos fenómenos de toxicidad en los animales controles, ni en aquellos que fueron inoculados con dosis menores de 1×10^{13} p.v/kg. Además, estudios clínicos previos en los que se han usado dosis bajas de adenovirus ($< 1 \times 10^{10}$ p.v/kg), han reportado una discreta toxicidad, aun después de la administración repetida del vector.^{12, 13, 20}

Otro aspecto que amerita ser evaluado es la interacción que guardan la predisposición individual a la infección por adenovirus, la idiosincrasia de la respuesta inmunológica, y las condiciones del microambiente hepático, con las características del vector, su dosificación y la vía de administración. Determinando esta interacción podemos predecir los efectos de una inyección local (IT) en un escenario sistémico, y comprender como una respuesta inmune esencialmente protectora se puede transfigurar en una cadena de eventos destructivos. A la luz de esta evidencia, es necesario proceder con cautela y realizar una evaluación clínica exhaustiva antes de utilizar vectores adenovirales en protocolos de terapia génica, especialmente cuando se pretende utilizar rangos de dosis cercanos al umbral de toxicidad.

Diseño experimental

Para investigar los efectos de la inmunidad humoral contra adenovirus en un modelo murino, se inocularon 45 animales con células de cáncer de mama. Después de un período de tumorigénesis de cuatro semanas, los animales fueron agrupados en tres diferentes grupos de estudio e inmunizados de la manera siguiente:

El primer grupo quedó conformado por 15 ratones inoculados por *vía subcutánea* con el vector adenoviral portador del gen reportero GFP. La cantidad de vector inoculada fue de 1×10^{11} p.v en 20%l. El segundo grupo de estudio quedó integrado por 15 ratones inoculados con la misma dosis del vector pero por *vía intratumoral*, mientras que el grupo control no recibió adenovirus y sólo se le inyectó por *-vía subcutánea-* Tris-GVL buffer. Adicionalmente, se inyectaron cinco ratones inmunodeficientes RAG-2, los

cuales fueron utilizados como segundos controles, ya que, aunque recibieron la inyección de adenovirus, no tienen capacidad de generar anticuerpos.

Dos semanas después de la inmunización (día 14), todos los animales fueron inoculados con un segundo tipo de adenovirus portador de la secuencia codificante de luciferasa, con la finalidad de monitorear los niveles de expresión de la proteína reportera dentro del tumor, así como la diseminación del vector a otros órganos. La inyección se realizó directamente dentro del tejido tumoral a una dosis de 1×10^{11} p.v./20 μ l.

Dos, siete y catorce días después de la reinmunización (días 16, 21 y 28) se sacrificaron cinco animales de cada grupo. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ovario, piel y tumores. Todos los órganos extraídos fueron examinados inmediatamente y de manera directa por medio de un microscopio de inmunofluorescencia, para efectuar un análisis cualitativo de los niveles de fluorescencia presentes en cada una de las muestras biológicas. Posteriormente, se realizó el ensayo de luciferasa con el propósito de determinar de manera cuantitativa los niveles de expresión de los genes reporteros.

Antes, durante y al final del experimento se tomaron muestras de sangre de cada animal (días 0, 14, 16, 21 y 28) con la finalidad de establecer los niveles de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus; mediante los ensayos de ELISA y de anticuerpos neutralizantes.

Para estudiar si la preinmunización permite el uso de dosis progresivas de adenovirus sin la presentación de hepatotoxicidad, se utilizó una población de 35 ratones Balb/c, los cuales fueron divididos en siete diferentes grupos de cinco ratones cada uno. Durante el día 0 del experimento, cinco grupos de animales recibieron preinmunización con AdV-FT2M59, mientras que dos grupos fueron inyectados con solución de amortiguador de fosfatos (PBS) para constituir los dos grupos control.

En el día 14, todos los animales preinmunizados fueron inyectados por vía intratumoral con dosis crecientes de AdV-Luc como se explica a continuación: grupo 1: 2×10^9 , grupo 2: 6×10^9 , grupo 3: 2×10^{10} , grupo 4: 6×10^{10} , grupo 5: 2×10^{11} , v.p./20 μ l/tumor. Del mismo modo, durante el día 14, a los 2 grupos de animales controles se les inyectó con AdV-Luc a una dosis de 2×10^9 , y 6×10^{10} Á9 C, serotipo Ad-5 de la familia Adenoviridae. Fueron construidos según el método propuesto por Rosenfeld y Bett²¹ dentro del Gene Vector Laboratory del Center for

Cell and Gene Therapy del Baylor College of Medicine, de Houston Texas. De acuerdo a las normas de las buenas prácticas de laboratorio, utilizando condiciones estándar.^{22, 23}

Durante la etapa de preinmunización se utilizó el AdV-5 AFT2M59, carente de genes reporteros (gutless), el cual fue empleado para inducir la producción de anticuerpos en el grupo de animales preinmunizados. El uso de un vector sin genes reporteros fue necesario para evitar la producción de anticuerpos en contra del transgen.

Para determinar la expresión cuantitativa de los genes reporteros se utilizó un segundo vector (Adv-Luc) de origen humano, portador de una secuencia exógena que codifica para una proteína enzimática conocida como luciferasa. Adv-Luc contiene un casete de expresión en la región E1, construido con el promotor de Citomegalovirus (CMV), el DNAC que codifica para luciferasa y la señal de poliadenilación de SV40. Ambos vectores adenovirales fueron propagados en células 293 y, posteriormente, purificados por centrifugación diferencial en gradientes de cloruro de cesio. La titulación de ambos vectores osciló entre un rango de 9×10^{12} vp/ml.^{23, 24}

Animales

Se utilizaron ratonas a la cepa Balb/c, de 20g de peso (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN). También se utilizaron ratonas inmunodeficientes de la cepa RAG-2 (recombinase activating 2 gene). Los animales homocigotos para la mutación en el gen RAG-2 carecen de células B y células T, ya que la delección de este gen ocasiona un bloqueo en la diferenciación temprana de estas líneas celulares.

Como criterio de terminación del experimento se decidió sacrificar a los animales con un crecimiento tumoral mayor de 2250 mm³, o de un peso igual o mayor al 10% del peso corporal. También se sacrificaron los animales enfermos que presentaron caquexia, dificultad respiratoria, hipoactividad y ataque a su estado general. La eutanasia se efectuó por asfixia en una atmósfera saturada con CO₂.

Líneas celulares

Para inducir el crecimiento de tumores en los animales experimentales, se utilizó la línea celular TM40-D. Esta línea se deriva de ratonas vírgenes normales de la cepa Balb/c y se generó a partir de células murinas del epitelio mamario (FSK), cultivadas du-

rante períodos de tiempo variable. Las células FSK fueron inyectadas en el tejido adiposo de las almohadillas mamarias de modelos murinos y después de 11, pasajes seriados, las células transplantadas generaron tumoraciones alveolares preneoplásicas con gran capacidad de tumorigénesis.²⁵ Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de CO₂, utilizando medio D-MEM suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Cuando la confluencia celular fue cercana al 80%, las células en monocapa fueron lavadas con PBS y, posteriormente, tratadas con tripsina al 5%, después de un nuevo lavado y centrifugado, las células fueron contadas, resuspendidas en D-MEM y finalmente inyectadas por vía subcutánea en la región dorso-lateral de cada uno de los animales bajo estudio.

Métodos

Ensayo de ELISA

Para la cuantificación de anticuerpos específicos en contra de adenovirus en el plasma de los animales preinmunizados, se utilizó un método indirecto de ELISA,²⁶ en donde el adenovirus-5 AFT2M59 fue utilizado como antígeno. Para este propósito se utilizó una solución de 8.87X10¹² p.v./ml, las partículas virales fueron fijadas por enlaces no covalentes en la base de una microplaca de titulación con 96 celdillas y el exceso de antígeno se lavó con una solución de amortiguador de fosfatos y detergente tween 20 (Phosphate Buffered Saline Plus Tween 20 (20X). Cat. RP 0014. ScyTek Laboratories. Logan Utah, U.S.A). Las celdillas fueron llenadas con superbloc blocking buffer en PBS (Pierce. Rockford, Illinois. U.S.A. Cat. No. 37515) para bloquear los epítopes inespecíficos de las proteínas que pudieran unirse con los anticuerpos y obstaculizar el ensayo.

Enseguida, se añadieron las muestras de suero en las celdas correspondientes; cualquier anticuerpo específico contra adenovirus se uniría a la fase sólida. El complejo de antígeno-anticuerpo fue cuantificado por medio de una técnica de "sándwich", utilizando un conjugado de anti-inmunoglobulina-enzima (Pierce Cat. No. 32490.), el cual se une al anticuerpo anti-Ad-5, previamente fijado en la fase sólida.

Finalmente, se añadió el sustrato para la enzima (3,3',5,5'-tetramethyl Benzidine Substrate Solution. Pierce Cat. No. 3402) que produce una reacción colorimétrica, la que fue cuantificada como

un incremento en la absorbancia, a través de un espectrofotómetro (ELX800 Universal Microplate Reader Bio-Tek Instruments).

Ensayo de neutralización de adenovirus. La técnica se realizó en células en cultivo, con la finalidad de medir la capacidad de los anticuerpos -específicos contra adenovirus- para inhibir la infección (lisis) de las células por las partículas virales en estudio. El título de neutralización fue visualizado como un marcador subrogado de la habilidad del anticuerpo para prevenir la infección *in vivo*.²⁷

Para tal efecto, se emplearon placas de 96 cavidades donde se mezclaron 50 µL de las diferentes diluciones del suero con igual volumen de cada uno de los aislamientos virales (100 TCID₅₀ Ui /0.05ml). Las diluciones fueron realizadas en medio MEM suplementado con suero fetal de ternera al 2% inactivado por calor. Después de incubar durante 1 h a 37 °C, se adicionaron 100 µL de una suspensión de células Vero -en medio 199, con suero fetal de ternera al 10% - a una concentración de 2X10⁵ células/ml.

Enseguida las placas fueron incubadas a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 3-5 días. Los resultados fueron obtenidos cuando el título de infectividad del virus fue de 30 a 300 TCID₅₀ Ui. El título de neutralización fue considerado como el 50% del efecto citopático (CPE) comparado con el control.

Ensayo de luciferasa. Para determinar cuantitativamente el nivel de expresión génica se utilizó un adenovirus portador de la secuencia reportera que codifica para luciferasa. La actividad de la enzima fue determinada por medio del ensayo de luciferasa²⁸ (Promega Madison, WI. U.S.A. Cat. E1500). Para iniciar el ensayo, cada tejido/órgano fue lavado con buffer de fosfatos, y cada muestra fue colocada en tubos de polipropileno conteniendo 2 ml de buffer de lisis [25 mM Tris -phosphate pH 7.8, 2 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM 1,2 diaminociclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100]. Posteriormente, cada uno de los tejidos en estudio fue sometido a homogenización mecánica, utilizando un homogenizador (Ultra-Turrax laboratory disperser/homogenizer, IKA works # 27950-00). Cada homogenizado fue sometido a centrifugación a 2000 RPM X 2min, con la finalidad de eliminar el sedimento de detritus celulares, mientras que el sobrenadante fue almacenado a -80°C.

Para medir la actividad de luciferasa, se mezclaron 20 μ l de cada homogenado con 100 μ l del reactivo de luciferasa [20Mm tricine, 1.07 mM ($MgCO_3$)₄ Mg (OH)₂.5H₂O, 2.67 Mm MgSO₄, 0.1 Mm EDTA, 33.3 Mm DTT, 270¼M coenzyme A, 470¼M luciferina, 530¼M ATP, pH final= 7.8]. Inmediatamente después se cuantificó la emisión de luz durante un período de 10 segundos, en un luminómetro modelo TD-20/20.

Tumorigénesis. Para establecer el modelo de tumorigénesis se utilizó la línea celular TM40-D, con la finalidad de producir una fenocopia de tumores ortotópicos en ratones Balb/c, y poder investigar los efectos de la respuesta inmune humoral sobre la transferencia y expresión genéticas de tumores inyectados con vectores adenovirales. Para este propósito, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (NembutalR, Abbott Laboratories. Chicago, IL) a una dosis de 50 mg/Kg. Posteriormente, cada animal fue inoculado con células TM40-D a una concentración de 1×10^6 , en un volumen de 50 μ l.

Después de un período de tumorigénesis de 3-4 semanas -en el cual los tumores alcanzaron un diámetro de 50 a 60 mm³,- los animales fueron inmunizados con AdV-Luc a una dosificación de 1×10^{11} p.v./20 μ l. Para evaluar el crecimiento tumoral, los tumores fueron medidos cada cuatro días en sus dos ejes perpendiculares, utilizando un calibrador digital tipo vernier; el volumen tumoral fue calculado con la fórmula $(a \times b^2)/2$, en donde *a* es el eje mayor y *b* es el eje menor del tumor.

Recolección de tejidos y muestras de suero. Para la obtención de las muestras de hígado, bazo, ovario, pulmón y tumores, se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical. Inmediatamente se realizó una laparotomía a cielo abierto, y se procedió a disecar y remover a cada uno de los órganos en estudio. Todas las muestras fueron colocadas en recipientes con nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C.

La extracción de sangre se realizó bajo anestesia general, siguiendo el método modificado de punción del seno retro-orbital. Para ello se utilizó una micropipeta de 200 μ l; con puntillas embebidas de heparina y cortadas en forma diagonal para facilitar la punción. De cada animal se extrajeron 200 μ l de sangre total, los cuales fueron centrifugados a 2000 RPM x 4 min, el plasma sobrenadante fue almacenado a -80°C para su estudio posterior.

Análisis enzimáticos. Para la determinación de la actividad de enzimas hepáticas se cuantificaron los títulos de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP). Los valores respectivos son reportados en Unidades Internacionales por Litro.

Estudio anatomopatológico. Durante la necropsia de los animales se procedió a recolectar los diferentes tejidos bajo estudio. Cada órgano fue sumergido en formol, después de su fijación los bloques fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. Los cortes se realizaron en un microtomo, obteniéndose una cinta de rebanadas de tejido de 5 a 8 micras de espesor. Finalmente, los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina y se examinaron con el microscopio de luz.

El hígado, pulmón y bazo de cada animal fueron examinados para la búsqueda de hepatitis, neumonía intersticial e hiperplasia esplénica. Los cambios histológicos fueron catalogados con una escala del 0 al 4, en donde el cero representa la morfología normal y el 4 severa inflamación, hiperplasia o necrosis.

Análisis estadísticos

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos durante los ensayos de luciferasa, ELISA y anticuerpos neutralizantes en los diferentes grupos de estudio, se realizó por medio de la prueba T de Student y del análisis de varianza unidireccional.

Resumen

“Efecto de la preinmunización con adenovirus sobre la eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia génica antitumoral”

Objetivo: Determinar si la inyección intratumoral de adenovirus portadores de genes reporteros induce, o no, la producción de anticuerpos en contra del vector, y establecer si la presencia de éstos influye en la efectividad terapéutica y toxicidad de la terapia génica del cáncer mediada por vectores adenovirales.

Resultados y conclusiones: En los animales no inmunizados, la diseminación de los vectores adenovirales desde el sitio de la inyección es homogénea y de carácter sistémico. La preinmunización oca-

siona una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor. El uso de dosis elevadas de vectores virales en animales con inmunidad preexistente, restituye los niveles de expresión intratumoral a niveles comparables con los observados en animales controles. Sin embargo, los fenómenos de toxicidad hepática observados en los animales preinmunizados necesitan ser estudiados con más detalle, debido a las enormes implicaciones terapéuticas que los vectores adenovirales tienen en el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: Adenovirus, Terapia Génica, Preinmunización, Toxicidad, Inmunidad preexistente.

Abstract

Objective: Preimmunization to adenoviruses may influence the therapeutic effectiveness and toxicity of adenoviral-mediated gene therapy for cancer. This study was undertaken to evaluate the impact of intratumoral preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity. Results and Conclusions: A preferential decrease in adenoviral vector expression is observed in liver compared to tumor after preimmunization. Higher adenoviral doses restore intratumoral adenoviral expression to levels comparable to those of naive animals. However, the hepatic toxicity observed in preimmunized animals needs to be further assessed due to the therapeutic implications for the treatment of cancer with multiple courses of adenoviral-mediated gene therapy.

Keywords: Adenovirus, Gene Therapy, Preimmunization, Toxicity, Pre-existing immunity.

Referencias

1. Horwitz, M.S. (1996). Adenovirus. *In Fields Virology*. (B. Fields, D.M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 2149-2171. Lippincott Philadelphia.
2. Trapnell, B.C. (1993). Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 12: 185-189.
3. Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Turz T, Boulanger P and Guillet JG. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and antipenton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J. Virol.* Mar; 72 (3): 2388-97.
4. Harvey B G, Hackett N R, El-Sawyt, Rosengart T K, Hirschowitz E A, Lieberman M D, Leesser M L and Crystal R G (1999): Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J. Virol.* Aug; 73 (8): 6729-42.
5. Kaplan, JM., ST. George, JA., Pennington, SE., Keyes, L.D., Johnson, RP., Wadsworth, SC., and Smith, AE. (1996). Humoral and cellular immune responses of non-human primates to long term repeated lung exposure. *Gene Ther.* 3,117-127.
6. Herman JR, Scardino PT, Aguilar-cordova E, Woo SLC, Hall SJ, Timme TL, and Thompson TC (1997): Phase I clinical trial of in situ gene therapy in men with locally recurrence of prostate cancer after radiation. *J. Urol.* 157: 1294A.
7. Katherine L. Molnar-Kimber., Daniel H, Sterman., Michael Chang., Eugen H, Kang, Mohammed ELBash., Michael Lanuti., Ashraf Elshami., Karen Gelfand, James M. Wilson., Larry R. Kaiser., and Steven M Albelda (1998): Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I trial for localized mesothelioma. *Human Gene Therapy* 9:2121-2133 (September 20).
8. Y Yang, FA Nunes, K Berencsi, EE Furth, E Gonczol and JM Wilson (1994): Cellular Immunity to Viral Antigens Limits E1-Deleted Adenoviruses for Gene Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 4407-4411, Copyright © by National Academy of Sciences.
9. Yang Y, Li Q, Ertl HC and Wilson JM (1995): Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol.* Apr;69(4):2004-15.
10. Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Propert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, and Batshaw ML. (2002): A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther.* 2002 Jan 1;13(1):163-75.
11. Cichon G, Boeckh-Herwig S, Schmidt HH, Wehnes E, Muller T, Pring-Akerblom P, and Burger R. (2001). Complement activation by

- recombinant adenoviruses. *Gene Therapy*. 8(23): 1794-1800.
12. Shalev M, Kadmon D, Teh BS, Butler EB, Aguilar-Cordova E, Thompson TC, Herman JR, Adler HL, Scardino PT, Miles BJ. (2000). Suicide gene therapy toxicity after multiple and repeat injections in patients with localized prostate cancer. *J. Urol.* 163(6), pp. 1747-1750.
 13. Vlachaki MT, Chhikara M, Aguilar L, Zhu X, Chiu KJ, Woo S, Teh BS, Thompson TC, Butler EB, Aguilar-Cordova E.. (2001). Enhanced Therapeutic effect of multiple injections of HSV-TK+GCV gene therapy in combination with ionizing radiation in a mouse mammary tumor model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51(4): 1008-1017
 14. Lamont JP, Nemunaitis L, Kuhn JA, Landers SA, and McCarty TM. (2000). A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann Surg Oncol.* Sep;7(8):588-92.
 15. Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner AS. *Gene Ther.* 4, pp. 1069-1076.
 17. Y. Yang, K. Greenough and J. M. Wilson, (1996) Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther.* 3, pp. 412-420.
 18. Sun MA, Wang BE, Annoni G, Degli Esposti S, Biempica L, Zern MA. (1990). Two rat models of hepatic fibrosis a morphologic and molecular comparison. *Lab. Invest.* 63 (4), pp. 467-475.
 19. Clabough DL, Gebhard D, Flaherty MT, Whetter LE, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ.(1991). Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 65 (11), pp. 6242-6251.
 20. Teh BS, Aguilar-Cordova E, Kern K, Chou CC, Shalev M, Vlachaki MT, Miles B, Kadmon D, Mai WY, Caillouet J, Davis M, Ayala G, Wheeler T, Brady J, Carpenter LS, Lu HH, Chiu JK, Woo SY, Thompson T, and Butler EB. (2001) , Phase I-II trial evaluating combined radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in the treatment of prostate cancer—a preliminary report. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51(3): 605-613.
 21. Bett A J, Haddara W, Prevec L and Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 91: 8802-8806.
 22. Bett AJ, Prevec L and Graham FL (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67: 5911-5921.
 23. Green M, and Pina M (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* 20, 199-207
 24. Strayer DS, Duan LX, Ozaki I, Milano J, Bobraski LE, and Bagasra O.. (1997): Titer replication-defective virus for use in gene transfer. *Biotechniques* 22(3), 447-450
 25. Kittrell F.S, Obom CJ and Medina D (1992): Development of mammary preneoplasias in vivo from mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Cancer Res.* Apr1; 52 (7):1924-32.
 26. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B and Stastny P. (2002): MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol.* Jan;63(1):30-9.
 27. Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Turz T, Boulanger P and Guillet JG. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and antipenton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity (1998): *J. Virol.* Mar; 72 (3): 2388-97.
 28. Mittal SK, McDermott MR, Johnson DC, Prevec L, and Graham FL. (1993): Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter. *Virus Res.* 28(1): 67-90.