



TERAPIA GÉNICA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Avances y desafíos

Grupo 40

Decuadra Rocha, Marcela

Del Torchio Da Silva, Renzo

Díaz Ramos, Horacio

Tenenbaum Calace, Nicolás

Orientador: Kramer Xavier, María Gabriela

Departamento de
Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene · Facultad de Medicina



Índice

- ✓ Introducción
- ✓ Metodología
- ✓ Cáncer de próstata: Epidemiología, patología y terapias convencionales
- ✓ Terapia génica
- ✓ Estrategias en terapia génica
- ✓ Conclusión
- ✓ Referencias

Introducción

El cáncer de próstata es actualmente la neoplasia de mayor incidencia en la población masculina del Uruguay y la segunda en mortalidad, a pesar de los distintos tratamientos disponibles. Por tal motivo, en este trabajo consideramos importante abordar el estudio de nuevas estrategias terapéuticas contra esta enfermedad enfatizando en la terapia génica por ser una opción muy prometedora en vistas al tratamiento del cáncer. Dado el escaso conocimiento e información que existe en nuestro ámbito clínico con respecto a los avances en esta área de la investigación, hemos optado por el abordaje de dicha temática exponiendo los resultados pre-clínicos y clínicos de las distintas modalidades de terapia génica para el tratamiento del cáncer de próstata.

A través de la realización de una búsqueda de artículos sobre ensayos clínicos y revisiones acerca de las diversas estrategias utilizadas, buscaremos acercarnos a los nuevos avances logrados en este campo, los cuales en un futuro, podrían llegar a aplicarse en nuestro país.

Metodología

Realizamos una búsqueda de revisiones y artículos acerca de las diversas estrategias utilizadas en terapia génica del cáncer de próstata. Dicha búsqueda se efectuó a través de bases de datos académicos específicos como son PubMed y Google Scholar mediante la utilización de palabras claves con el objetivo de obtener información acerca de la patología en sí misma, su incidencia en el mundo y Uruguay, dificultades respecto a tratamientos actuales y nuevas terapias en desarrollo, técnicas en terapia génica (*in vivo*, *ex vivo*) especialmente enfocadas al cáncer de próstata, experimentación en fase preclínica (animales) y clínica (humanos). Utilizamos el programa Mendeley que gestiona documentos y referencias bibliográficas para citar las fuentes consultadas en el trabajo realizado.

Cáncer de próstata: Epidemiología, patología y terapias convencionales.

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna con mayor incidencia en hombres en Uruguay con un 60,72% de casos según la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer y ocupa el segundo lugar en mortalidad por cáncer con el 21,14% en la población masculina ¹. A nivel mundial, el cáncer de próstata es el segundo cáncer más diagnosticado en hombres (899.000 nuevos casos al año, 13,6% del total) ². Aproximadamente el 75% de los casos se registran en países desarrollados. Las tasas de incidencia más altas se observan en Australia y Nueva Zelanda (104,2 por 100.000), Europa y Norteamérica. Las tasas de incidencia son relativamente altas en algunas regiones en desarrollo como el Caribe, América del Sur y África. La incidencia más baja se observa en Asia (4,1 por 100.000) ².

En la actualidad, se han establecido firmemente únicamente tres factores de riesgo para el cáncer de próstata, todos ellos no modificables: la edad, la raza, y una historia familiar positiva de cáncer de próstata ³.

- **Edad:** El riesgo de cáncer de próstata aumenta progresivamente desde los 50 años (y desde los 40 años si hay antecedentes familiares). La incidencia de cáncer de próstata en autopsias es bastante alta, aumentando desde el 20% a los 50 años hasta 70% en varones entre 70 y 80 años de edad ^{3, 4}.
- **Raza:** La raza afro-descendiente tiene una incidencia mayor de esta enfermedad y presentan al momento del diagnóstico estadios más avanzados, por el contrario en los asiáticos es muy infrecuente este tipo de cáncer ^{2, 3, 4}.
- **Historia familiar:** Parece ser que el cáncer de próstata afecta más a algunas familias, lo cual sugiere que en algunos casos puede haber un factor hereditario o genético. Si el padre o el hermano de un hombre padecen cáncer de próstata, se duplica el riesgo de que este hombre padezca la enfermedad (el riesgo es mayor para los hombres que tienen un hermano con la enfermedad que para aquellos con un padre afectado

por este cáncer). Asimismo, en el caso de los hombres que tienen dos o más familiares de primer grado afectados el riesgo de padecerlo es de 5 a 11 veces más, particularmente si tales familiares eran jóvenes en el momento en que se les diagnosticó el cáncer ^{3, 5}.

Con respecto a la patología, los andrógenos (hormonas masculinas) tienen un papel destacado en la aparición de este tipo de cáncer. El crecimiento y el desarrollo de las células cancerosas prostáticas dependen de los andrógenos, que se unen a los receptores androgénicos (RA) e inducen la expresión de genes responsables del crecimiento y la supervivencia ⁶.

En aproximadamente el 70% de los casos el cáncer de próstata se origina en la zona periférica de la glándula, clásicamente en una región posterior de la misma, que a menudo se hace palpable en el tacto rectal. El cáncer de próstata se extiende localmente por invasión directa, y a través de las vías sanguíneas y linfáticas. Por extensión local, lo más frecuente es que afecte a las vesículas seminales y a la base de la vejiga urinaria. La diseminación hematógena se produce sobre todo en los huesos, principalmente en los del esqueleto axial, pero algunas metástasis anidan ampliamente en las vísceras. Histológicamente la mayoría de las lesiones corresponden a adenocarcinomas ^{7, 8}.

Los carcinomas de próstata al igual que otros tipos de cáncer, se clasifican en grados de malignidad y estadios de extensión. Se han descrito varios sistemas de gradación, de los cuales el sistema de Gleason es el más conocido. En el sistema de Gleason, el cáncer de próstata se divide en cinco grados según los patrones de diferenciación glandular. El grado 1 representa los tumores mejor diferenciados, mientras que los de grado 5 no muestran diferenciación glandular, encontrándose entre éstos, variables de diferenciación. La mayoría de los tumores contienen más de un patrón, en cuyo caso se asigna un grado principal al patrón dominante y un grado secundario al segundo patrón más frecuente, los dos grados de suman y se obtiene un grado o una puntuación de Gleason combinado, por ejemplo un tumor con grado 3 dominante y un grado 4 secundario representaría una puntuación de 7, en consecuencia los tumores

mejor diferenciados tienen un grado de Gleason de 2 (1+1) y los peor diferenciados un score de 10 (5+5) ⁹. La estratificación en grados tiene especial importancia, porque por lo general hay una correlación directa entre el pronóstico y el grado de diferenciación. Asimismo también es importante para seleccionar la pauta terapéutica adecuada y para establecer un pronóstico ¹⁰.

Dentro de los tratamientos más utilizados actualmente en el cáncer de próstata se incluyen: la cirugía (prostatectomía), la radioterapia y la manipulación hormonal. Más del 90% de los pacientes que reciben tratamiento tienen una esperanza de vida de 10 años. El tratamiento más frecuente para el cáncer de próstata clínicamente localizado es la prostatectomía radical y como terapia alternativa la radioterapia (externa o braquiterapia) ¹¹.

El carcinoma metastásico avanzado se trata mediante la privación androgénica ¹¹. El objetivo de este tratamiento es reducir los niveles de andrógenos en el organismo, o prevenir que estas hormonas alcancen las células cancerosas de la próstata ¹². Los andrógenos principales son la testosterona y la dihidrotestosterona, los cuales estimulan el crecimiento de las células cancerosas de la próstata por lo que esta terapia provoca que se reduzca el tamaño de los cánceres o que crezcan más lentamente por un tiempo. Sin embargo, la terapia hormonal sola no cura el cáncer de próstata. Se pueden emplear varios tipos de terapia hormonal para tratar el cáncer de próstata. Algunos tipos reducen los niveles de testosterona u otros andrógenos (orquiectomía, administración de agonistas sintéticos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)), y otros bloquean la acción de esas hormonas (anti-andrógenos) ¹². Para que los andrógenos puedan funcionar, éstos se tienen que unir a una proteína en la célula llamada receptor de andrógeno ¹². Luego de una fase inicial hormono-dependiente, pasados los 18 a 24 meses de comenzada la terapia de privación hormonal, en la cual el paciente responde a la misma, el tumor se vuelve independiente de la actividad del receptor de andrógenos por lo que se hace Hormono independiente y la terapia deja de ser útil ¹³. Como causas de esto se han descrito la amplificación y mutación del gen del receptor de andrógenos que generan su activación constitutiva independiente

del ligando o la expresión de receptores que responden a estrógenos, progesterona e incluso anti-andrógenos¹³.

Considerando que los pacientes con cáncer de próstata localizado son a menudo tratados con éxito con la prostatectomía radical y la radioterapia, las opciones terapéuticas eficaces para los pacientes con metástasis andrógeno-independiente están limitadas. Se necesitan estrategias para mejorar aún más los resultados de supervivencia para los pacientes en estadio avanzado ¹¹.

La inmunoterapia específica surgió como una modalidad de tratamiento prometedor para el cáncer prostático avanzado ¹⁴. Las células T y los anticuerpos son componentes de gran alcance de la respuesta inmune antitumoral específica; los linfocitos T CD8 + y los citolíticos naturales (NK) pueden reconocer de manera eficiente y destruir las células tumorales que exponen péptidos intracelulares derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) a través de la molécula de superficie del complejo principal de histocompatibilidad (CPH o HLA) de clase I, y células T CD4+ que reconocen péptidos de superficie presentados por el CPH de clase II, ambas expresadas por las células presentadoras de antígenos (CPA) que también juegan un papel importante en la inmunidad antitumoral ¹⁴. Una de las modalidades de tratamiento más estudiadas ha sido la vacunación con células dendríticas cargadas de antígenos tumorales, induciendo la respuesta de células T específicas de tumor ¹⁴. Recientemente se aprobó el uso de una vacuna terapéutica que consiste en células dendríticas autólogas cargadas con una proteína de fusión entre PAP (fosfatasa ácida prostática) y el factor GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) ¹⁵.

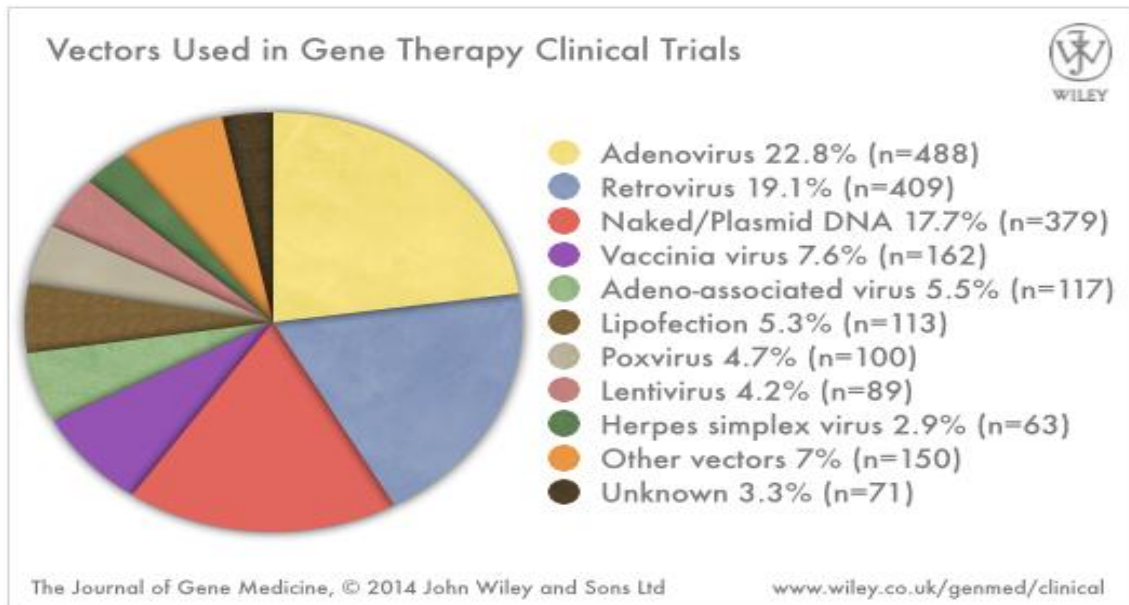
Otro tipo de terapia que se está ensayando en fase pre-clínica y clínica para el tratamiento del cáncer de próstata y otros tipos de cáncer es la denominada terapia génica en la que centraremos la atención de esta revisión. Algunas modalidades de esta terapia ya fueron aprobadas para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello en países como China.

Terapia Génica

Se puede definir la terapia génica como la transferencia de material genético a células del organismo con el fin de corregir deficiencias heredadas o adquiridas y obtener así un beneficio terapéutico. Esto se logra mediante tres estrategias fundamentales: 1- Complementar o sustituir el defecto en la función del gen introduciendo una copia del gen normal en estas células; 2- Inhibir o bloquear el funcionamiento de proteínas que contribuyen al desarrollo de la enfermedad; 3- Introducir genes que permitan a la célula sintetizar una nueva proteína con efecto terapéutico ¹⁶. La transferencia génica se realiza a través de vectores, los cuales pueden clasificarse en virales y no virales. Los vectores virales más utilizados en ensayos pre-clínicos y clínicos son derivados de Adenovirus, Retrovirus, virus Adeno-asociados y Virus Herpes Simplex. (Fig. 1A y Tabla 1) En lo que refiere a los vectores no virales encontramos vectores químicos como son: Fosfato cálcico, Liposomas mediados por receptores (utilizado en cáncer de próstata) y también vectores mecánicos como por ejemplo Micro-inyección y Electroporación ¹⁷.

Existen dos técnicas a través de las cuales se lleva a cabo la terapia génica, una es *in vivo* y la otra *ex vivo*. En la primera de ellas el material genético es introducido mediante vectores directamente en la célula diana a través del torrente circulatorio o por inyección intratumoral, no hay extracción previa de las células ni manipulación *in vitro*. En la segunda, las células a tratar son previamente extraídas, aisladas y crecidas en cultivo realizando la transferencia génica *in vitro*. Luego estas células modificadas se devuelven al paciente para que cumplan su función. (Fig.1B)

A



B

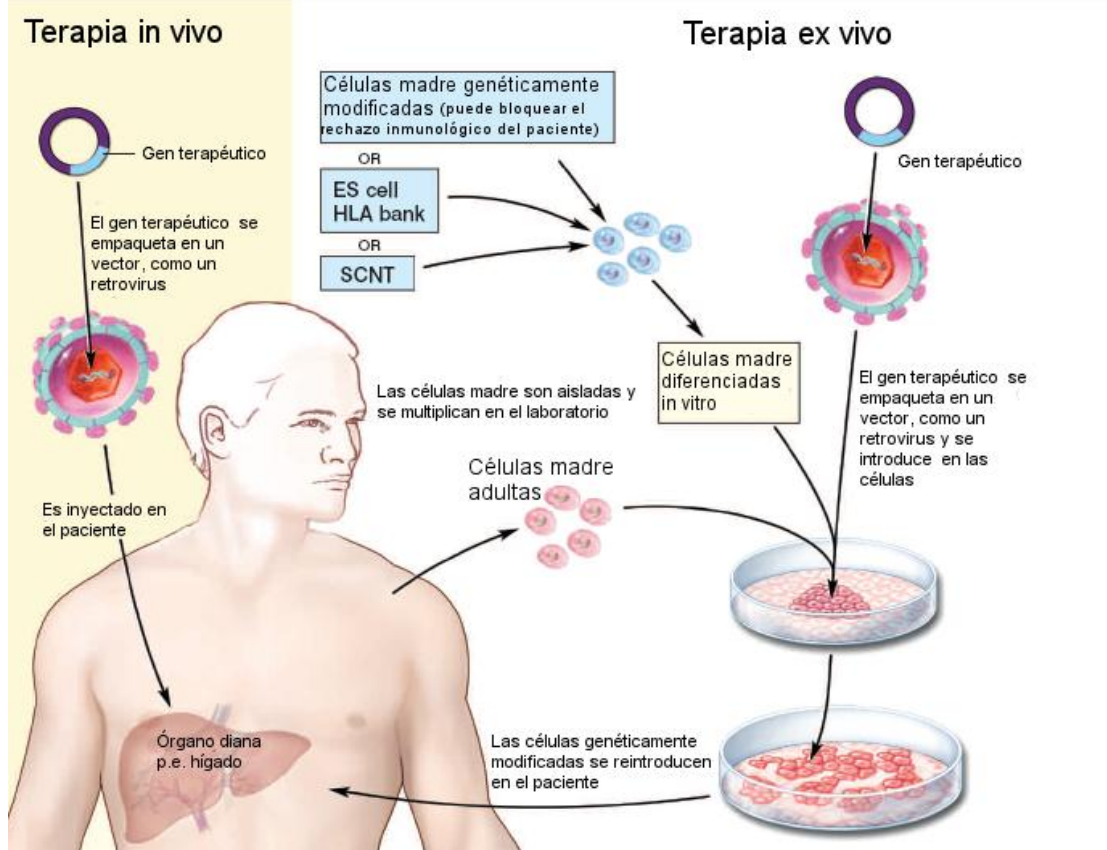


Figura 1- A. Vectores más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. **B.** Técnicas in vivo y ex vivo utilizadas en terapia génica

Vectores virales	Material Genético	Capacidad de empaquetamiento	Tropismo	Integración al ADN	Ventajas	Desventajas
<u>Envueltos</u>						
Retrovirus	ARN	8 kb	Células en división únicamente. Pleiotropismo	Si	Generación de altos títulos virales. Integración estable al genoma del huésped.	Inestabilidad de algunos vectores retrovirales. Posible mutagénesis insercional. Requiere células en división.
HSV-1	ADNdc	30- 50 kb	Principalmente células neuronales	No. (Episoma)	Gran capacidad de inserción de genes. Infección latente en células en división y no división.	Expresión transitoria del gen.
<u>No envueltos</u>						
AAV	ADNcs	<5 kb	Pleiotropismo.	SI <10% No >90%	Sin reacción inflamatoria.	Baja capacidad de empaquetamiento.
Adenovirus	ADNdc	8kb* 37kb**	Pleiotropismo	No	Máxima eficiencia transduccional en la mayoría de los tejidos. Infectan células en división o no. Seguridad clínica.	Respuestas inflamatorias mediadas por la cápside.

Tabla 1: Vectores virales más utilizados. HSV-1: Herpes virus simple tipo 1; AAV: Virus Adenoasociados; ADNdc: ADN doble cadena; ADNcs: ADN de cadena simple; *Adenovirus de primera generación que tiene algunos genes virales, replicación condicionada; **Adenovirus de tercera generación, no tienen genes virales.

La terapia génica puede emplearse en el tratamiento de diversas patologías como ser: enfermedades genéticas, cardiovasculares, infecciosas, neurodegenerativas y el cáncer, siendo esta última el área de mayor aplicación en ensayos clínicos ¹⁸.

En lo que respecta a la aplicación de la terapia génica en el cáncer de próstata las estrategias más utilizadas son: 1) Terapia viral oncolítica; 2) Sustitución de oncosupresores defectuosos; 3) Terapia génica suicida; 4) Inmunoterapia génica ¹⁹. En esta revisión vamos a comentar cada una de ellas en detalle tanto en modelos animales de cáncer de próstata como ensayos clínicos.

Estrategias en terapia génica del cáncer de próstata

Terapia génica viral oncolítica.

El uso de virus de replicación competente, capaces de replicarse y destruir exclusivamente células neoplásicas es una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer ²⁰. Esta terapia se denomina oncolítica y consiste en utilizar la propia capacidad replicativa y citolítica del virus para destruir células tumorales pero no de las células normales del huésped. (Fig. 2)

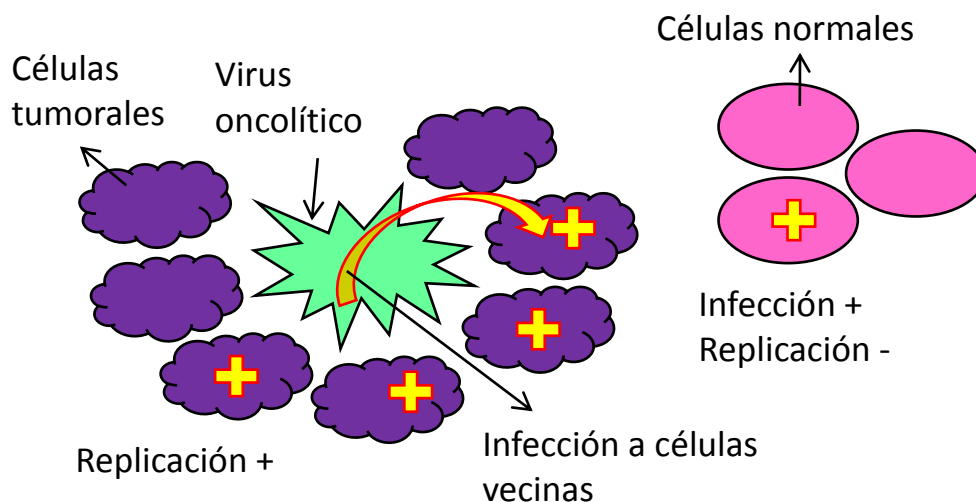


Figura 2- Los virus oncolíticos se replican y destruyen células tumorales de manera selectiva. La progenie viral producida dentro de las células tumorales, es liberada y se propaga por las demás células cancerosas repitiendo el ciclo, lo que lleva a la destrucción de las mismas. El virus no es capaz de replicarse en células normales del huésped.

Esto se logra mediante dos estrategias principales:

- 1- Delección de genes virales necesarios para la replicación del virus cuya función puede ser compensada en células tumorales (delección selectiva);
- 2- Colocar un gen viral implicado en su replicación bajo el control de un promotor tumor o tejido específico²⁰. (Fig. 3)

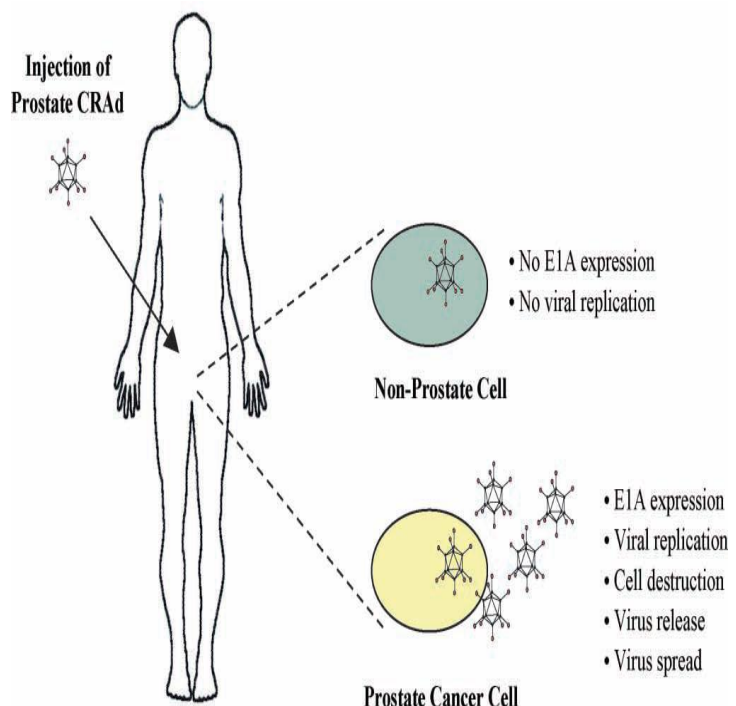


Figura 3- Terapia oncolítica adenoviral: Un CRAd (adenovirus de replicación competente condicionada) con la expresión del gen E1A controlado por un promotor próstata específico, se replica específicamente en células tumorales de cáncer de próstata causando su lisis²¹.

Los virus más utilizados para la terapia oncolítica son el HVS-1 y el Adenovirus (Ad) por su habilidad para infectar un

amplio espectro de células tumorales, replicarse en ellas y formar progenie viral que al liberarse causa la lisis celular y se propagan a células vecinas. Los adenovirus capaces de lisar únicamente a células tumorales diana se han denominado CRAbs (conditionally replication-competent adenovirus/ adenovirus de replicación competente condicionada) ¹³. (Fig.2)

1- Vectores replicantes con delección selectiva: La estrategia más comúnmente usada para generar virus oncolíticos es la eliminación de genes virales que son esenciales para la propagación del virus en las células sanas, pero no en las células tumorales. Por lo tanto la replicación viral ocurre solo en vías celulares que están desreguladas. Un ejemplo de ello es el virus dl1520 (ONYX-015) que contiene una alteración en el gen de E1B-55kb, lo que lleva a que no se produzca dicha proteína. Por lo tanto el virus únicamente se replica en células que contengan un p53 no funcional (una situación que es muy frecuente en células tumorales) ¹³.

2- Vectores replicantes regulados por promotores tumor o tejido específicos: Utilizada principalmente para generar adenovirus oncolíticos, colocan la expresión de genes virales necesarios para la replicación del virus (por ejemplo el gen E1 de Ad, (ver genes Adenovirales en Tabla 2), bajo el control de un promotor específico de cáncer. Para el tratamiento del cáncer de próstata se han empleado promotores y potenciadores de los genes del PSA Y PSMA (Antígeno de membrana próstata específico) ²¹.

Regiones (genes) Ads.	Función
E1	Incluye genes cuyos productos son encargados de la replicación viral y modular el metabolismo celular permitiendo así el aumento de la susceptibilidad celular a la infección viral. (*)
E2	Genes cuyas proteínas están relacionadas con la síntesis viral
E3	Modulación de la respuesta inmune del huésped y lisis celular.
E4	Regulación de la expresión génica viral, transporte de ARNm, replicación de ADN y apoptosis.

Tabla 2: Regiones adenovirales. (*) Las proteínas E1A interfieren con el proceso de división celular mediante la unión a otras proteínas miembros de la familia de proteínas del retinoblastoma (pRb). El bloqueo de pRb permite la liberación de factores de transcripción de la familia E2F que activa la transcripción de genes requeridos para el ingreso en la fase S del ciclo celular. Para evitar la apoptosis temprana debido a la transcripción aumentada de E1A la proteína E1B 55kd se une al p53 e inhibe la actividad apoptótica. Ads: (adenovirales) ²¹.

Se han llevado a cabo varios ensayos preclínicos para valorar la eficacia y seguridad de los distintos virus oncolíticos. G207 (Tabla 3) fue probado en las líneas celulares prostáticas DU145 y PC3 (Principales líneas celulares del cáncer de próstata) para evaluar *in vitro* los efectos citopáticos de G207 y su habilidad de replicación, donde se demostró que su eficacia citopática llega al 99% al día 7 post infección, así como la dosis-dependencia de la replicación viral; e *in vivo* mediante la implantación de dichas células en ratones donde se observó una supresión estadísticamente significativa ($p < 0.001$) del crecimiento del tumor en ambas líneas celulares en comparación con los controles luego de la infección con G207 ²². CN706 (Tabla 3) fue valorado mediante su inyección intratumoral en xenoinjertos de cáncer de próstata productores de PSA (células LNCaP, las cuales se definen como células de adenocarcinoma prostático sensibles a andrógenos) resultó en una rápida regresión de estos tumores y una disminución del PSA sérico ²⁰. CG7870 (Tabla 3), se estudió en combinación con radioterapia

mediante la utilización de cultivos celulares de LNCaP y xenoinjertos de LNCaP en ratones (inyección intratumoral) ²³. Se demostró que la combinación de dichos tratamientos aumenta la eficacia antitumoral del adenovirus oncolítico (sin perder su especificidad por las células cancerosas) dado un aumento de la replicación viral en las células irradiadas previamente, genera una mayor supresión del tumor (estadísticamente significativo), aumenta el tiempo de progresión de la enfermedad y provoca disminuciones en el PSA sérico. No se observaron efectos adversos adicionales a aquellos causados por el tratamiento único con radioterapia ²³. El más novedoso de los virus oncolíticos, Ad[Δ PPT-E1A] (Tabla 3) en varios ensayos preclínicos mostró citotoxicidad específica por las células prostáticas, ausencia de efectos citotóxicos en otros órganos (se demostró que los riesgos de efectos nocivos son despreciables y que la replicación viral está confinada a células prostáticas y el virus no es perjudicial para otros tejidos y órganos), un aumento significativo en la supervivencia de los animales que recibieron el tratamiento con Ad[Δ PPT-E1A] así como en la disminución del PSA sérico y en el tamaño del tumor ²⁴.

Algunos de estos virus oncolíticos han sido estudiados en diversos ensayos clínicos.

CN706 y CG7870 fueron probados en ensayos clínicos (fase I). CN706 fue administrado mediante inyección transperitoneal guiada por ultrasonografía transrectal (ITgUTR) ²⁵, en 20 pacientes con recurrencia de cáncer de próstata localizado luego de la radioterapia, para evaluar la seguridad y la actividad intraprostática del mismo. El ensayo mostró que CN706 es seguro y no está asociado a eventos de toxicidad irreversible. La mayoría de los pacientes presentaron linfopenia clínicamente no significativa a las 48 hs, que volvió a sus valores basales luego de 7 días pos-tratamiento. No se observaron alteraciones significativas de la coagulación ni de la función hepática. En cuanto a los valores de PSA, la respuesta de los 20 pacientes fue dosis dependiente: los cinco pacientes que llegaron a una reducción mayor o igual al 50% de sus valores iniciales de PSA habían recibido las dosis mayores de CN706 ²⁵. CG7870 fue evaluado en 23 pacientes con cáncer de próstata metastásico refractario a

terapia hormonal, mediante su inyección intravenosa ²⁶. Los síntomas similares a los presentados en el curso de una infección respiratoria viral fueron los hallazgos colaterales más comunes (fiebre, fatiga, náuseas, vómitos). A mayores dosis se observaron aumento transitorio de las transaminasas hepáticas y trombocitopenia. A su vez a dosis relativamente altas se encontró una leve inflamación hepática asociada en algunas instancias a elevación de D dímeros (un marcador de coagulación intravascular diseminada) y elevación de la IL-6 como marcador de la respuesta antiviral. No se observó una respuesta parcial o completa del PSA, sin embargo cinco pacientes presentaron disminución de 25% - 49% del PSA sérico, 3 de los cuales habían recibido las dosis más altas ²⁶. Ad[I/PPT-E1A] está siendo utilizado en un ensayo clínico fase I (Comenzado a finales del 2013) para evaluar su tolerancia y seguridad y efectos histopatológicos e inmunológicos como tratamiento adyuvante previo al tratamiento con prostatectomía radical) ²⁴, (primer estudio en evaluar la combinación de dichos tratamientos).Ad[I/PPT-E1A] será administrado mediante ITgUTR tres semanas antes de la remoción quirúrgica de la próstata a distintas dosis, en 12 a 18 hombres de entre 35 y 70 años quienes serán evaluados y monitorizados intensivamente para valorar efectos adversos y toxicidad durante las 3 semanas. Se evaluarán además los cambios a nivel de la inmunidad innata y sistémica, los perfiles adaptativos del sistema inmune así como la presencia de células T tumor y adenovirus específicas ²⁴.

Si bien varios ensayos preclínicos han demostrado seguridad y gran efecto citopático, aún se requieren más estudios clínicos que evalúen y certifiquen su eficacia. Sin embargo consideramos que el desarrollo de estos virus puede ser una terapia.

Virus oncolítico	Promotor	Vía de administración	Terapia combinada	Modelo animal/ensayo clínico	Respuesta antitumoral			
					PSA	T.tm	r/i.Mt	Sv
CV706 (Ad5, E1A, E3(-), p.PSA) *	PSA	i.t		Ratón (Xenoinjertos de células LNCaP)	↓	↓	N.D	N.D
		i.t		Ensayo clínico fase I	↓	N.D	N.D	N.D
CG7870 (E1A, E1B,p.probasin, p.PSA)**	PSA Probasine	i.t	Radioterapia	Ratón (Xenoinjertos de LNCaP)	↓	↓	N.D	N.D
		i.v		Ensayo clínico fase I	↓	N.D	N.D	N.D
Ad[I/PPT-E1A] ***	TARP	i.t		Ratón (xenoinjertos de células PC3).	↓	↓	N.D	↑
G207(HSV-1,γ 34.5 (-), LacZ)****	HSV-1	i.t		Ratón (implantación de células PC3 y DU145)	N.D	↓	N.D	N.D

Tabla 3: Terapia viral oncolítica. *Creado mediante la inserción de un potenciador/promotor específico de próstata (PSE), derivado del extremo 5' del gen de PSA, en el genoma de un adenovirus tipo 5 (Ad5), con el fin de dirigir la expresión del gen EA1.) **La expresión de los genes E1A y E1B están bajo el control del promotor del gen probasina de rata y el promotor de PSA humano respectivamente. Adicionalmente la región adenoviral E3 ha sido mantenida, lo que suprime la respuesta inmune del huésped. ***E1A está controlado por una secuencia sintética reguladora que comprende el potenciador de PSA y del PSMA (Antígeno de membrana próstata-específico), y el promotor del gen TARP (t cell receptor gamma chain alternate Reading frame protein), el cual es expresado únicamente en células epiteliales prostáticas y en células del cáncer de próstata. ****Presenta delecciones en ambas copias del gen γ 34.5 (que es el principal determinante viral para la neurovirulencia y además bloquea la respuesta inmune del huésped a la infección), la inserción del gen lacZ de *E.coli* el cual inactiva al gen ICP6 (Este gen encubre una larga subunidad de la enzima HSV-ribonucleotidoreductasa encargada de la síntesis de ADN viral y requerida para la correcta replicación viral en células que no están en división). DU-145, PC-3, LNCaP: modelos celulares de cáncer de próstata humano, Ad: adenovirus; p: promotor; HVS-1: herpes virus simple tipo 1; i.t: intratumoral; i.v: intravenoso; T.tm: Tamaño tumoral; r/i Mt: reducción inhibición de las metástasis; Sv: supervivencia; N.D: No determinado; Flecha ascendente: Incremento; Flecha descendente: Descenso.

Sustitución de oncosupresores (p53) defectuosos

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17 y es la diana más frecuentemente alterada en tumores humanos. Aproximadamente el 50% de los tumores humanos contiene mutaciones de este gen. La pérdida homocigótica de p53 se encuentra virtualmente en todos los tipos de cáncer. En la mayoría de los casos las mutaciones inactivadoras afectan ambos alelos de p53 y son adquiridas en las células somáticas ²⁷. El hecho de que las mutaciones de p53 sean frecuentes en diversos tumores humanos sugiere que la proteína p53 funciona como un guardián crítico para la formación del cáncer. En efecto es evidente que p53 actúa como un “policía molecular” que impide la propagación de células genéticamente dañadas.

La proteína p53 es un factor de transcripción que está en el centro de una gran red de señales que detectan tensión celular, daños del ADN, telómeros acortados e hipoxia ²⁸. Esta proteína frustra la transformación neoplásicas mediante varios mecanismos entrelazados: (Fig. 4)

1. Inducción de la detención transitoria y/o permanente del ciclo celular
2. Desencadenamiento de la muerte celular programada (apoptosis)
3. Inhibición de la angiogénesis

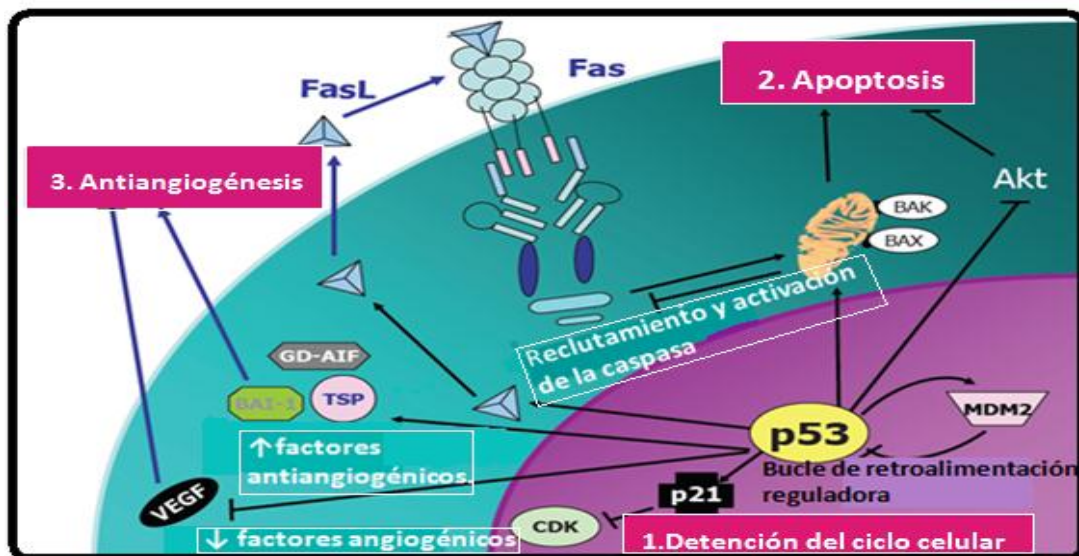


Figura 4- Rutas principales del p53 y su mecanismo de acción sobre moléculas efectoras. Modificado de Sunil Chada *et al*, 2008 ³⁰.

La proteína p53 se une a regiones reguladoras del ADN e induce la expresión de varios genes inhibidores incluyendo p21/WAF1/CIP1/MDA6, un potente inhibidor de la ciclina D1 que media la transición de la fase G1/S del ciclo celular, por cual células que han sufrido daño genético son frenadas en la fase G1 del ciclo permitiendo la reparación del ADN (Fig. 4). Si ésta reparación es inadecuada p53 puede desencadenar la apoptosis. Si el gen p53 es inactivado no se puede inducir la apoptosis, permitiendo que las células que tienen daño a nivel del ADN sobrevivan y acumulen mutaciones favoreciendo la inestabilidad genómica y la transformación oncogénica ²⁹.

Mediante la terapia génica se busca sustituir el gen mutado o defectuoso de p53 incluyendo en las células tumorales una nueva secuencia normal del gen (wtp53). Se ha documentado en estudios pre-clínicos que células tumorales *in vivo* luego de ser complementadas con wtp53 inducían la detención del ciclo celular, la apoptosis e inhibición de la angiogénesis. Estos estudios emplean como vectores adenovirus de serotipo 5 recombinante de replicación defectuosa

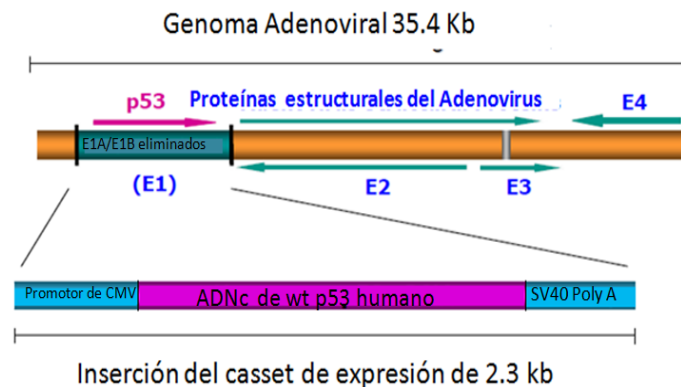


Figura 5- Estructura del genoma adenoviral y del vector (Ad5CMV-wp53). Modificado de Sunil Chada *et al*, 2008 ³⁰.

(Ad5) que contiene una secuencia del gen de wtp53 bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) Ad5CMV-p53 ³⁰. (Fig. 5)

Se aplicaron inyecciones intratumorales de Ad5CMV-p53 en distintos tumores con xenoinjerto en ratones y se demostró que la transducción del gen de wtp53 en diferentes tipos de células cancerosas que carecen de p53 normal aumenta su sensibilidad a la apoptosis y por lo tanto podría aumentar su sensibilidad a las radiaciones ionizantes. Se probó en un estudio preclínico la combinación de ambas terapias (inyección intratumoral de Ad5CMV-p53 y radioterapia)

comparando grupos que recibieron éstas por separado en relación con otro grupo que recibió ambas terapias. El resultado fue una diferencia significativa entre grupos ($p < 0,05$), con resultados a favor del grupo tratado con Ad5CMV-p53 y radioterapia, observando un descenso en el nivel sérico de PSA y un crecimiento tumoral más lento (Tabla 4) ³¹. Asimismo se ha estudiado la transferencia de genes wtp53 en combinación con el tratamiento quimioterapéutico en modelos animales de xenoinjertos tumorales humanos de pulmón, de mama, cabeza y cuello, próstata y ovario y se ha visto una significativa supresión del crecimiento del tumor y mayor apoptosis que cualquier otro agente por sí solo ²⁹.

Estos resultados preclínicos han servido como impulso para los estudios clínicos que exploran la eficacia del gen wtp53 al ser transducido en pacientes con cáncer avanzado. Actualmente están en curso múltiples ensayos clínicos que utilizan la administración intratumoral de Ad5CMV-wtp53 sólo y en combinación con radioterapia y múltiples fármacos citostáticos en pacientes con cáncer de casi todos los tipos. De acuerdo a la base de datos del NIH (National Institutes of Health) hay 29 ensayos clínicos en curso empleando el gen wtp53 para la terapia de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata, la mayoría de ellos en fase I de los ensayos y el resto en fase II y III) ³². Todos los ensayos clínicos han demostrado la seguridad, viabilidad clínica y la ausencia de efectos adversos. En general, los resultados de los ensayos clínicos en humanos empleando wtp53 son prometedores.

Otra proteína importante para controlar la proliferación celular en células tumorales es p21. En un estudio comparativo entre la administración de wtp53 y p21 realizado en ratones con tumores de próstata singénicos implantados por vía subcutánea se demostró que la tasa de crecimiento y volumen final del tumor se reduce a un grado mayor en los ratones que han recibido inyección intratumoral de Ad5CMV-p21 en comparación con Ad5CMV-p53. Además, la supervivencia de animales portadores de tumores que eran tratados con Ad5CMV-p21 fue significativamente mayor (Tabla 4) ³³. Estos datos indican que

p21 también podría ser un gen terapéutico interesante para realizar ensayos clínicos de terapia génica.

Terapia génica suicida

La terapia génica suicida está basada en la introducción de un gen viral o bacteriano que permite la conversión de un producto no tóxico en uno letal para la célula tumoral (Fig. 6). También se lo conoce como “tratamiento gen de la enzima-profármaco”. Muchos tipos de sistemas suicidas han sido estudiados, entre ellos el gen timidin kinasa del herpes simplex virus (HSV-TK) con el profármaco ganciclovir (GSV) y el gen de la citocina deaminasa (CD) de *E. coli* que convierte un agente anti-fúngico 5 – fluorocitocina (5-FC) en 5 – fluoracilo (5-FU) que es tóxico para las células tumorales ³⁴.

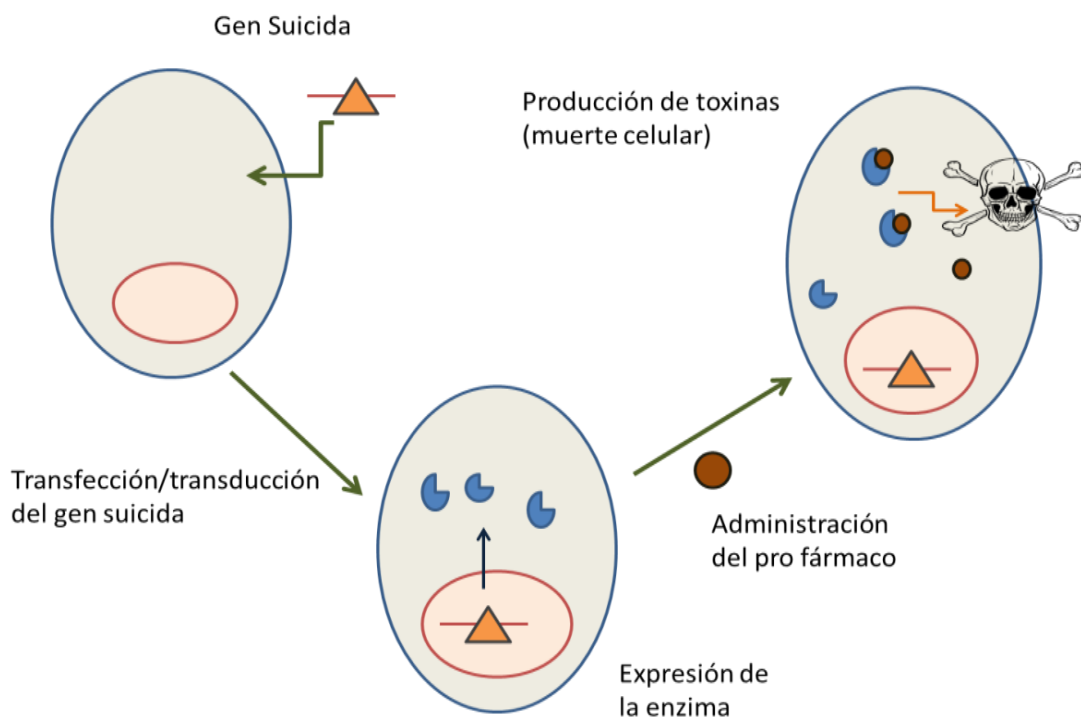


Figura 6- Inducción al tumor de un gen viral o bacteriano (gen suicida que codifica para un enzima) y administración de un producto no tóxico (pro-fármaco) para que sea transformado por el enzima en un compuesto tóxico (toxina) que inducirá la muerte de la célula tumoral.

El sistema HSV-TK/GSV es uno de los más prometedores. La expresión del gen HSV-tk conduce a la producción de timidin kinasa viral que metaboliza ganciclovir en ganciclovir monofostato; a continuación quinasas celulares pueden convertir este último en trifosfato de ganciclovir el cual es análogo del trifosfato de desoxiguanosina, lo cual hace que introducido en el ADN de la célula tumoral (durante la replicación del ADN) produzca terminación de la cadena y por lo tanto muerte de la célula tumoral ³⁴.

La regresión del tumor se produce incluso cuando un pequeño porcentaje de células tumorales son infectadas con el gen HSV-tk. Se han explicado varias hipótesis para explicar la muerte de las células vecinas y distantes de las células tumorales transducidas. Es lo que se conoce como el “efecto bystander” ³⁴. La terapia génica suicida se asocia con dos efectos bystander distintos, uno local y otro distante (Fig. 7). En el efecto local solo un pequeño porcentaje de células tumorales expresan el gen suicida aun así se logra la disminución de un gran número de células tumorales. Esto se logra mediante difusión pasiva de la droga o de los metabolitos tóxicos generados por las células que expresan el gen suicida hacia células que no lo expresan, el paso del fármaco a través de las uniones gap o la endocitosis de vesículas apoptóticas por las células tumorales³⁴. El efecto distante consiste en la regresión del tamaño en tumores distantes a células transfectadas con genes suicidas, asociado a la estimulación del sistema inmune y la liberación de factores solubles como son los metabolitos de ganciclovir fosforilado como mecanismos efectores de dicho efecto. (Fig. 7)

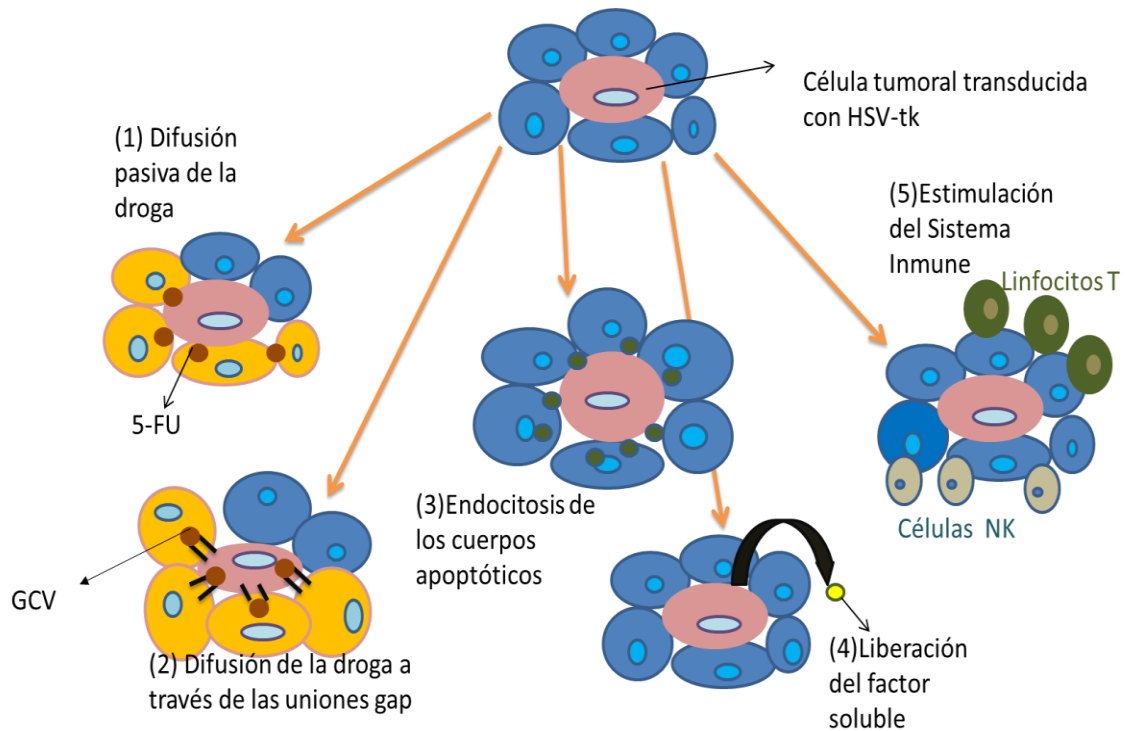


Figura 7- Hipótesis de muerte en células lindantes a las transfectadas/transducidas mediado por efecto bystander. Rosado: célula tumoral que expresa el gen suicida. Azul: células tumorales no transducidas. Naranja: células tumorales no transducidas afectadas por el fármaco tóxico. Verde: cuerpos apoptóticos, Amarillo: Factor soluble (metabolitos de ganciclovir fosforilado). (1) Difusión pasiva del 5-FU (5-fluorouracilo) de células que expresan gen suicida hacia las células vecinas que no lo expresan. (2) Difusión del GCV (ganciclovir) a través de las uniones gap. (3) Endocitosis de los cuerpos apoptóticos. (4) Liberación del factor soluble. (5) Estimulación del sistema inmune (Linfocitos T y Natural Killer). (1), (2), (3) Efecto bystander local, (4) (5) Efecto bystander a distancia

En el sistema CD/5 FC (fluorocitina) se ha visto que la enzima CD- encontrada en varias bacterias y hongos pero no en células de mamífero- cataliza la deaminación hidroelectrolítica de citocina en uracilo. Este sistema puede convertir el pro fármaco no tóxico 5-FC en 5-FU que es transformada por enzimas celulares en potentes antimetabolitos (5-FdUMP, 5-FdUTP, 5-FUTP). El 5-FUTP puede incorporarse al ARN en el lugar de UTP lo cual da como resultado la inhibición del procesamiento del ARNm. El 5-FdUMP inhibe irreversiblemente la timidilato sintasa (TS) que cataliza la reacción de síntesis del timidilato (dTMP) la cual es un paso fundamental en la formación de desoxitimidina 5'-trifosfato

(dTTP), un metabolito necesario para la correcta síntesis y reparación del ADN. Esto trae como consecuencia la inhibición de la síntesis del ADN de la célula tumoral mediante la formación de un complejo covalente.(Fig.8)

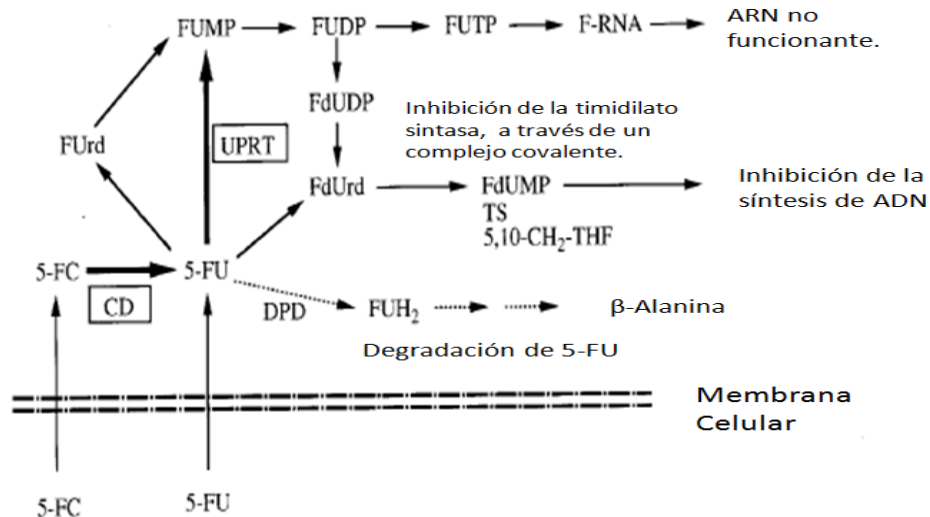


Figura 8- El metabolismo del 5-FU y el mecanismo de modulación de CD y UPRT. Las flechas continuas, las punteadas y en negrita indican la vía de activación, la vía de inactivación, y pasos enzimáticos de CD y UPRT respectivamente. Las células de mamíferos no pueden convertir 5-FC en 5-FU y no puede convertir directamente 5-FU a FdUMP debido a la falta de CD y UPRT, respectivamente. UPRT: uracilfosforibosiltransferasa, FURD, 5-fluorouridina; FUDP, difosfato de 5-fluorouridina; FdUDP, difosfato de 5-fluorodesoxiuridina; FdUrd, 5-fluorodesoxiuridina. Modificado de Fumikazu Koyama *et al*, 2000 ⁵⁵.

Una de las principales ventajas de este sistema sobre HSV-TK/GSV es que posee un fuerte efecto bystander local que no requiere contacto célula-célula entrando a las mismas por difusión pasiva ³⁵.

Sin embargo, el gen que mayoritariamente se utiliza en la terapia génica suicida para el cáncer de próstata es el HSV-tk (el cual se aplica directamente en el tumor a través de una inyección) así como el pro fármaco ganciclovir por vía intraperitoneal. Dado que el ganciclovir no es tóxico, no genera daños a nivel sistémico. Generalmente se utiliza un adenovirus como vector, pero existen estudios que utilizan plásmidos (secuencias de ADN circular bacteriano extra-cromosómicos). La ventaja de estos últimos es que activan menos el sistema

inmune y van dirigidos más específicamente hacia el órgano blanco. La principal limitación *in vivo* es la baja eficiencia de la transfección. El plásmido está unido a un ligando de folato y como las células tumorales poseen receptores de folato (FR) utilizan este para su entrada a las mismas ³⁶.

Algunos estudios han combinado la utilización de dos genes suicidas CD y HSV-tk asociado a sus respectivos pro-fármacos. Esta estrategia ayuda a la sensibilización de las células tumorales frente a la radioterapia. Esos efectos combinados (conocido como doble terapia génica suicida) resultan en la destrucción definitiva de las células tumorales, que, cuando se combinan con la señal de peligro generada por un vector adenoviral, pueden provocar el procesamiento de antígenos tumorales generando una eficiente inmunidad antitumoral (Tabla 5) ³⁷.

Un ensayo preclínico demostró que el cáncer de próstata es buen candidato para la utilización del gen HSV-tk. Para esto usaron diferentes tipos de vectores virales (adenovirus, lentivirus, virus espumoso de simios, SFV y Sinbis virus) transportando el gen HSV-tk y administrando GCV. Para comparar la eficacia de estos vectores se observó el efecto bystander que generaban en las células tumorales DU-145, PC-3, LNCaP y se concluyó que los vectores más eficaces eran los adenovirus (Tabla 5) ³⁸.

Varios ensayos clínicos con genes suicidas en fase I y II, han demostrado la reducción de las masas tumorales generando pocos efectos adversos. Una de las formas de comprobar la eficiencia de los estudios es que han mostrado una reducción objetivable de los niveles de PSA lo cual hacen de la terapia génica una opción considerable. ^{37 39 40}. Nasu y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico en fase I dirigido a pacientes con recidiva local en cáncer de próstata después de la terapia hormonal. Dicho estudio se realizó en 8 pacientes a los cuales se les administro HSV-tk mediado por adenovirus, seguido de GCV. En 5 pacientes se observó un descenso del PSA lo que confirma la posibilidad de respuesta clínica a nivel de un marcador indirecto (Tabla 5) ³⁹.

Otro estudio clínico reciente, en fase II, ha estudiado la radioterapia en combinación con la terapia génica suicida. En este estudio se utilizó como vector el adenovirus oncolítico Ad5-yCD/mutTKSR39rep-ADP⁴⁰, conteniendo dos genes fusionados: yCD (citosina deaminasa de levadura) y mutTKSR39 (herpes simplex virus thymidin kinasa mutante SR39⁴¹ ; dicha tk presenta cinco sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a nucleósidos ⁴². Los productos enzimáticos del gen fusionado son catalíticamente más activos y generan mejores efectos terapéuticos así como un mayor aumento de la sensibilidad de la célula a la radioterapia ⁴¹. Además el adenovirus expresa grandes niveles del gen de la proteína de muerte del adenovirus ADP, (rep-ADP) el cual se encuentra codificado en la región E3 del Ad serotipo 2 ⁴³, lo que aumenta la actividad oncolítica del adenovirus. En dicho estudio se tomaron 44 pacientes con cáncer de próstata en estadio T1/T2, Gleason 5/6 o concentraciones de PSA de hasta 20 ng/ml. Estos fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos. El primer grupo recibió únicamente radioterapia, el segundo la inyección intratumoral de Ad5-yCD/mutTKSR39rep-ADP y el tercero radioterapia y Ad5-yCD/mutTKSR39rep-ADP. Como resultado se observó que la terapia combinada muestra una disminución de biopsias positivas (presencia de células neoplásicas malignas) a los 2 años, sin exacerbar los efectos secundarios observados con el tratamiento radioterápico solo ni deteriorar la calidad de vida de los pacientes ⁴⁰.

En cuanto a la terapia génica suicida podemos concluir que se ha demostrado su eficacia y seguridad en ensayos clínicos en fase I y II lo cual la hace una estrategia apropiada para el tratamiento del cáncer a futuro.

Inmunoterapia génica

Utilizando la terapia génica como base, en este caso el objetivo es estimular el sistema inmune con la finalidad de que éste sea el que elimine las células tumorales o utilizarla como adyuvante para que éstas puedan ser destruidas con radioterapia, hormonoterapia o afectando su aporte sanguíneo ⁴⁴.

En este tipo de terapia no se elimina a la célula tumoral directamente por el producto del gen, sino por células del propio sistema inmune que son activadas por el producto del gen terapéutico como pueden ser citoquinas pro inflamatorias como IL-2, IL-12, GM-CSF o antígenos tumorales como PSA que se transfieren mediante vectores a células tumorales o células del sistema inmune ⁴⁴.

El mecanismo básico para desarrollar una respuesta antitumoral es a través de la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos que son capaces de reconocer antígenos tumorales y destruir las células que los expresan ⁴⁵. Las estrategias de terapia génica mayormente empleadas para lograr esta respuesta antitumoral son:

1. Inyección intratumoral de vectores conteniendo genes de citoquinas.
2. Inyección intratumoral de vectores conteniendo genes que codifican moléculas co-estimuladoras ⁴⁶.
3. Administración de células dendríticas modificadas *ex vivo* para que expresen antígenos tumorales específicos.

1- La administración de genes codificadores de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8 e IL-12) o el GM-CSF estimulan una respuesta tumoral que es independiente del complejo de histocompatibilidad tipo I, ya que utiliza el complejo de histocompatibilidad tipo II por medio de las células asesinas naturales (NK) que producen la destrucción de las células tumorales ⁴⁷. Además al destruirse la células se liberan antígenos tumorales que son reconocidos por el sistema inmune e inducen la secreción local de citoquinas lo cual estimula la acción de linfocitos T CD8+ que incrementan su número, se activan y destruyen las células que expresan dichos antígenos ⁴⁸.

2- La inyección intratumoral de vectores conteniendo genes que codifican moléculas co-estimuladoras como lo es la B7 (proteína de membrana presente en las células presentadoras de antígenos), potencia el efecto anti-tumoral

activando con mayor eficacia las células efectoras del sistema inmune frente al tumor ⁴⁹.

3 - Aplicación de vacunas con células dendríticas, basado en la transferencia *ex vivo* de ADN o ARN de antígenos tumorales a células dendríticas del propio paciente, las cuales expresarán estos antígenos específicos del tumor, luego van a ser inyectadas nuevamente al organismo con el objetivo de presentar dichos antígenos a células efectoras del sistema inmune y así lograr una respuesta anti-tumoral más específica y más eficaz ⁵⁰.

Cuando se compararon los resultados producidos por la administración de genes de IL-2, GM-CSF o interferón gamma (IFN- γ) en ratones a los que se les habían implantado células tumorales de próstata por vía subcutánea se observó que la IL-2 provocaba la curación de los animales, mientras que GM-CSF mostró ser menos efectivo ⁴⁹. Similares resultados se han observado en modelos de cáncer de próstata en ratones a los que se les inyectaron vectores con IL-12, con disminución del número de metástasis pulmonares ⁴⁸.

Se han realizado algunos estudios preclínicos comparando los resultados obtenidos mediante la aplicación de IL-12 sola o asociada a moléculas co-estimuladoras ⁵¹. La asociación de IL-12 y la molécula co-estimuladora B7 produjo una reducción significativa del tamaño tumoral y un incremento de la sobrevida en los ratones comparado con los controles y con los animales a los que se les había inyectado solamente IL-12 ⁴⁹.

En un estudio en fase I con 24 pacientes con cáncer de próstata localmente avanzado se administraron dos inyecciones intraprostática en serie del gen de IL-2 (Leuvectin®) utilizando liposomas como vector ⁵². Los pacientes se dividieron en dos grupos; uno de ellos incluyendo a los pacientes candidatos a prostatectomía radical y el otro a aquellos en los cuales había fracasado un tratamiento previo ⁵³. La terapia génica con IL-2 fue bien tolerada; los efectos adversos más frecuentes fueron hematuria leve, hemorragia rectal transitoria y

molestias perineales probablemente atribuidas a la propia inyección. Luego del tratamiento se evidenció la activación inmune sistémica, dado el aumento en la intensidad de la infiltración de células T (visto en el análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido obtenidas de los sitios tumorales inyectados y el aumento de linfocitos en sangre periférica después del tratamiento). Se observó una disminución del PSA en 16 de 24 pacientes, los cuales en su mayoría pertenecían al grupo en los cuales había fallado un tratamiento previo ⁵².

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígenos más potentes capaces de activar a las células-T. Las CD cargadas con antígenos tumorales mediante técnica *ex vivo*, son capaces de generar una potente respuesta inmunológica antitumoral en ratones. La transferencia de ARNm codificantes de antígenos tumorales específicos, es un buen método para cargar antígenos en CD. La transfección de células dendríticas con este ARNm es simple, reproducible y efectiva. Estudios preclínicos demostraron que CD generadas de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata y pacientes sanos, transfectadas con ARNm de PSA, fueron capaces de estimular la respuesta de células-T PSA específicas ⁵⁰.

En base a estudios se llevó a cabo un ensayo clínico fase I, donde se tomaron 16 pacientes con cáncer de próstata metastásico refractario a terapia hormonal. Estos fueron vacunados con dosis escaladas de CD transfectadas con ARNm de PSA en intervalos bi-semanales. Dicha vacuna fue bien tolerada. No se observaron efectos adversos graves, y se demostró una disminución transitoria del número de células tumorales circulantes, y descenso pequeño, pero estadísticamente significativo del PSA ⁵⁰.

En un estudio en fase I/II en 19 pacientes con cáncer de próstata se aplicaron inyecciones intradérmicas con células dendríticas transfectadas (DC-vacunas) con ARNm de tumores autólogos. Se evidenció una respuesta específica de células T en 12 de los 19 pacientes y no se observaron efectos adversos graves. Trece pacientes con cáncer de próstata desarrollaron una

disminución del PSA, el descenso del PSA se relacionó significativamente con la respuesta de las células T ($P = 0,002$). (Tabla 6) ⁵⁴.

Si bien esta modalidad de inmunoterapia génica parece prometedora, existen limitaciones tales como transducir un número alto de células del tumor. En relación al tratamiento *ex vivo* con células dendríticas se concluye que la vacuna-DC es factible y segura, y que las respuestas de células T son provocadas en aproximadamente 50% de los pacientes.

Oncosupresores	Gen	Vía de administración	Terapia combinada	Modelo Animal/Ensayo Clínico	Respuesta antitumoral			
					PSA	T.tm	r/i.Mt	Sv
Ad5CMVp53	p53	s.c		Ratones singénicos	N.D	↓	N.D	↑
Ad5CMVp21	p21	s.c		Ratones singénicos	N.D	↓	N.D	↑
Ad5CMVp53	p53	i.t	Radioterapia	Ratones (Xenoinjertos LNCaP)	↓	—	N.D	N.D

Tabla 4: Sustitución de oncosupresores. Ad5: Adenovirus serotipo 5, CMV: Citomegalovirus, p53: gen supresor tumoral, p21: gen supresor tumoral regulado por p53.

Genes Suicidas	Gen	Vía de administración	Terapia combinada	Modelo Animal/ensayo Clínico	Respuesta antitumoral			
					PSA	T.tm	r/i.Mt	Sv
HSV-tk	Tk	i.t	GSV	DU-145, PC-3, LNCaP(cultivos celulares) in vitro	↓	N.D	N.D	N.D
HSV-tk	Tk	i.t	GSV y CD	Ensayo clínico fase I	↓	↓	N.D	N.D
HSV-tk	Tk	i.t	CD / 5-FC	Ensayo clínico fase I	↓	↓	N.D	N.D
HSV-tk	Tk	i.t	Radioterapia	Ensayo clínico fase II	↓	↓	N.D	N.D

Tabla 5: Terapia génica suicida. HSV-1: Herpes simplex virus tipo 1, tk: Gen de Timidin-Kinasa, GSV: Ganciclovir, CD: Citosin-Deaminasa.

Interleucinas (vectores)	Gen	Vía de administración	Terapia combinada	Modelo Animal/ensayo Clínico	Respuesta antitumoral			
					PSA	T.tm	r/i.Mt	Sv
Ad5-IL-12/B7	IL-12/B7	i.v	No	Ensayo preclínico (ratones)	↓	---	N.D	---
Ad5-IL-12	IL-12	i.v	No	Ensayo preclínico (ratones)	↓	↓	N.D	↑
Liposomas IL- 2	IL-2	i.t	Radioterapia	Ensayo clínico fase I	↓	↓	N.D	N.D
Electroporación	ARNm	i.d		Ensayo Clínico Fase I/II	↓	N.D	N.D	N.D
Transfección	PSA	ex vivo		Ensayo clínico Fase I	↓	N.D	N.D	N.D

Tabla 6: Terapia génica combinada con inmuno terapia. IL-2: Interleucina-2, IL-12: Interleucina-12, B7: Molécula Co-estimuladora presente en CPA. Ad: adenovirus; p: promotor; HVS-1: herpes virus simple tipo 1; i.t: intratumoral; i.v: intravenoso; T.tm: Tamaño tumoral; r/i Mt: reducción inhibición de las metástasis; Sv: sobrevida; N.D: No determinado; Flecha ascendente: Incremento; Flecha descendente: Descenso.

Conclusión

La falta de terapias curativas para el cáncer de próstata avanzado así como el desarrollo de resistencia al tratamiento en una gran cantidad de casos, necesita del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La terapia génica es una modalidad novedosa y muy prometedora para el tratamiento del cáncer de próstata basada en la administración intratumoral de vectores con genes terapéuticos, ya que no es una glándula esencial y es de fácil acceso. Todas las estrategias testeadas han puesto de manifiesto resultados favorables en estudios preclínicos en cuanto a seguridad y eficacia. Sin embargo, la gran mayoría de los ensayos clínicos se encuentran en fase I, los cuales si bien han demostrado seguridad, dada la escasa o nula aparición de efectos secundarios graves, no son suficientes para indicar la eficacia de dicha terapia. Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de las distintas estrategias, se destaca una disminución del PSA sérico en todas ellas. La reducción del tamaño tumoral fue evidente únicamente en los ensayos clínicos destinados a evaluar la terapia génica suicida y en combinación con inmunoterapia. Aunque múltiples genes están implicados en el desarrollo del cáncer y la progresión a la malignidad, modelos preclínicos y estudios clínicos han demostrado que la administración de un solo gen, como *wtp53*, puede arrestar el crecimiento de las células tumorales, inducir la apoptosis y la regresión del tumor en estadios avanzados. En ese sentido hay varios ensayos clínicos en marcha en base a complementación de oncosupresores como *wtp53*, si bien los resultados aún no son concluyentes. Los virus oncolíticos han demostrado un efecto antitumoral significativo y los protocolos se pueden optimizar para ofrecer varias de estas terapias simultáneamente. Futuros estudios podrán servir de base para progresar hacia ensayos clínicos en fases más avanzadas que demuestren un mayor nivel de evidencia que permitan su aplicación como terapia en el cáncer de próstata.

Referencias

1. Registro Nacional de Cáncer – Uruguay. No Title. - C.H.L.C.C (*Comisión Honor. Lucha Contra el Cáncer*) Uruguay 1 at <http://www.comisioncancer.org.uy/uc_359_1.html>
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, P. D. Cancer incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No 10. *Int. Agency Res. Cancer* **2.0**, (2010).
3. Leitzmann, M. F. & Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **4**, 1–11 (2012).
4. Ekman P, et al. Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. *EurUrol* 35–362 (1999).
5. Hemminki K, et al. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol* **2**, 143 (2012).
6. Al, A. M. et. Replacing the mouse androgen receptor with human alleles demonstrates glutamine tracts length-dependent effects on physiology and tumorigenesis in mice. *Mol Endocr.* 20–1248 (2006).
7. Epstein JI, N. G. Biopsy interpretation of the Prostate. *JB Lippincott Williams Wilkins* (2008).
8. Eble JN et al. Pathology and Genetics: Tumors of the urinary system and male genital organs. WHO classification of tumors. *Word Heal. Organ.* (2004).
9. Al, E. J. et. Up date on the Gleason grading system of prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic phatologists. *AdvAnatPathol* 13–57 (2006).
10. Gleason DF, M. G. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* **58**, 111 (1974).
11. Mottet, N. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **59**, 572–83 (2011).
12. American Cancer Society. ACS. www.cancer.org at <www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide>

13. Maria Exblad, G. H. Adenovirus-based gene therapy for prostate cancer. *Thomson Reuters* **12**, 421–431 (2010).
14. Kiessling A. et al. Tumor-Associated Antigens for Specific Immunotherapy of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. **4**, 193–217 (2012).
15. Eddie Thara, et al. Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer. *Matur. ELSEVIER* **69**, 296–303 (2011).
16. Cristiano, J. A. R. and R. J. Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going? *JNCI J Natl Cancer Inst* **89**, 21–39 (1997).
17. Fillion, M. C. & Phillips, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1329**, 345–56 (1997).
18. Samantha L. Ginn et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. GENE Med. J Gene Med* **15**, 65–77 (2013).
19. Ahmed, K. a et al. Progress in gene therapy for prostate cancer. *Front. Oncol.* **2**, 172 (2012).
20. Hiroshi Fukuhara, Y. H. and T. T. Oncolytic virus therapy for prostate cancer. *Int. J. Urol.* **17**, 20–30 (2010).
21. Essand, M. Gene therapy and immunotherapy of prostate cancer: Adenoviral-bases strategies. *Acta Oncol. (Madr)*. **44**, 610–627 (2005).
22. Masafumi Oyama, Takashi Ohigashi, Michio Hoshi, Masaru Murai, K. U. and T. Y. Oncolytic Viral Therapy for Human Prostate Cancer by Conditionally Replicating Herpes Simplex Virus 1 Vector G207. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 1399–1344 (2000).
23. Jeannete Dilley, Seshidhar Reddy, Derek Ko, Natalie Nguyen, Ginny Rojas, Peter Working, D.-C. Y. Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity: Cancer Gene Therapy. **12**, 715–722 (2005).
24. Ellen Schenk, Magnus Essand, Robert Kraaij, Rachel Adamson, Norman J, M. and C. H. B. Preclinical Safety Assessment of Ad[Δ VP1/VP2-EA1], a Novel Oncolytic Adenovirus for Prostate Cancer; Human Gene Therapy. *Clin. Dev.* **25**, 7–15 (2014).
25. Theodore L. Deweeae, Henk van der Poel, Shidong Li, Bahar Mikhak, Rence Derew, Marti Goemann, Ulrike Hamper, Robert Dejong, Nicholas Detorie, Ronal Rodriguez, Thomas Haulk, Angelo M. DeMarzo, Steven

- Piantadosi, D.C. Yu, Yu Chen, Daniel R. Henderson, Micha, J. W. S. A phase I Trial of CV706, a Replication-competent, PSA Selective Oncolytic Adenovirus, for the Treatment of Locally Recurrent Prostate Cancer following Radiation Therapy. *Cancer Res.* **61**, 7464–7472 (2001).
26. Eric J. Small, Michael A. Carducci, James M Burke, Ron Rodriguez, Lawrence Fong, Lynn van Ummesen, D. C Yu, Junko Aimi, Dale Ando, Peter Working, David Kirn, G. W. A phase I Trial of Intravenous CG7870, a Replication-Selective, Prostate-Specific Antigen-Targeted Oncolytic Adenovirus, for the Treatment of Hormone-Refractory, Metastatic Prostate Cancer. *Mol. Ther.* **14**, (2006).
 27. Vousen K, L. D. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **8**, 275 (2007).
 28. Riley T, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 402 (2008).
 29. Lebedeva, I. V, Su, Z. Z., Sarkar, D. & Fisher, P. B. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 169–78 (2003).
 30. Sunil Chada, et al. Development of Adenovirus vectors – from preclinical to Phase III. *iSBTc Oncol. Biol. Dev. Prim.* (2008).
 31. Cowen, D. et al. Prostate Cancer Radiosensitization in Vivo with Adenovirus-mediated p53 Gene Therapy Prostate Cancer Radiosensitization in Vivo with Adenovirus- mediated p53 Gene Therapy 1. 4402–4408 (2000).
 32. OBA, N. Human Gene Transfer Clinical Trials Database. <http://www.nih.gov/> (2002).
 33. Nasu, Y. et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther.* **6**, 338–49 (1999).
 34. Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., de Lima, M. C. P. & Pierrefite-Carle, V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett.* **324**, 160–70 (2012).
 35. Philippe Erbs, Etienne Regulier, Jacqueline Kintz, et al. In vivo Cáncer Gene Therapy by Adenovirus-mediated Transfer of a Bifunctional Yeast Cytocine Deaminase/Uracil Phosphoribosyltransferase Fusion Gene. *Am. Assoc. Cancer Res.* **60**, 3813–3822 (2010).

36. Maitani, Y. H. & Y. Folate-linked nanoparticle-mediated suicide gene therapy in human prostate cancer and nasopharyngeal cancer with herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.* **12**, 796–809 (2005).
37. Freytag, S. O. *et al.* Phase I Study of Replication-competent Adenovirus-mediated Double Suicide Gene Therapy for the Treatment of Locally Recurrent Prostate Cancer Phase I Study of Replication-competent Adenovirus-mediated Double Suicide Gene Therapy for the Treatment of Local. 4968–4976 (2002).
38. Sami Loimas, Marjo Riita Toppin, Tapio Visakorpi, *et al.* Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **8**, 137–144 (2001).
39. Yasutomo Nasu, Takashi Saika, Shin Ebara, *et al.* Suicide Gene Therapy With Adenoviral Delivery of HSV-tk Gene for Patients With Local Recurrence of Prostate Cancer After Hormonal Therapy. *Mol. Ther.* **15**, 834–840 (2007).
40. Svend O. Freytag, Hans Stricker, Mei Lu, *et al.* Prospective Randomized Phase 2 Trial of Intensity Modulated Radiation Therapy With or Without Oncolytic Adenovirus-Mediated Cytotoxic Gene Therapy in Intermediate-Risk Prostate Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* **89**, 268–276 (2014).
41. Svend O Freytag, Benjamin Movsas, I. A. Phase I Trial of Replication-Competent Adenovirus-Mediated Suicide Gene Therapy Combined with IMRT for Prostate Cancer. *Mol. Ther.* **15**, 1016–1023 (2007).
42. Ralph Weissleder, Brian. D. Ross, Alnawaz Rehemtulla, S. S. G. Molecular Imaging. Principles and practice. *People's Med. Publ. House-USA* 655 (2010).
43. - J. Hausmann, D. Ortmann, E. Witta, M. Veith, W. S. Adenovirus Death Protein, a Transmembrane Protein Encoded in the E3 Region, Is Palmitoylated at the Cytoplasmic Tail. *Virology* **244**, 343–351 (1998).
44. Thomas-Kaskel AK, *et al.* Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. *Int. J. Cancer* **121**, 467 – 473 (2007).
45. Al, B. J. V. den E. *et.* T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 684 – 693 (1997).
46. Steven A Rosenberg, J. C. Y. and N. P. R. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909 – 915 (2004).

47. Susy M scholl, Michaelis, Silke, M. D. R. Gene therapy applications to cancer treatment. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, 35 – 47 (2003).
48. Nasu Y, et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther.* **6**, 338 – 349 (1999).
49. Gerald W. Hull, et al. Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated Expression of IL 12 with IL-12 plus B7 for in situ Gene therapy and gene Modified, Cell-based vaccines. *Clin Cancer Res* **6**, 4101 (2000).
50. Eli Gilboa, J. V. Cancer Immunotherapy with mRNA- transfected dendritic cells. *Immunol Rev* **199**, 251–263 (2004).
51. S Varghese, SD Rabkin, R Liu, P. N. Enhanced therapeutic efficacy of IL-12, but not GM-CSF, expressing oncolytic herpes simplex virus for transgenic mouse derived prostate cancers. *Gene Ther.* **2005**, 253 – 265 (13AD).
52. Allan J. Pantuck MD, A. S. B. M. Phase I clinical trial of interleukin 2 (IL-2) gene therapy for prostate cancer. *J. Immunother.* **27**, 240–253 (2004).
53. K Kuribayashi, S Gillis, D E Kern, and C. S. H. Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J Immunol* **126**, 2321 – 2327 (1981).
54. Jon A. Kyte, G. G. Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol.* **55**, 1432–1442 (2006).
55. Al, F. K. et. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of Escherichia colicytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1015–1022 (2000).