

## Perspectivas del uso de drogas informacionales en cáncer

Andrés A. Gutiérrez,\* Luis Ángel Sánchez F,\* Jaime Mas-Oliva\*

### Introducción

El cáncer es un trastorno genético de las células somáticas, cuyas clonas se caracterizan por un patrón de crecimiento anormal. Los avances recientes de la biología molecular del cáncer han puesto en claro que el proceso de tumorigénesis es progresivo y por pasos múltiples. Este involucra: 1) la activación de vías de estimulación de crecimiento y/o la inhibición de muerte celular que están bajo el control de oncogenes dominantes, y 2) la inactivación de vías inhibitorias del crecimiento y/o la estimulación de la muerte celular que son controladas por genes supresores tumorales también conocidos como antioncogenes o emerogenes.

Todo este conocimiento, aunado a las limitaciones de la terapéutica oncológica actual, ha generado un enorme entusiasmo para tratar de encontrar nuevas modalidades terapéuticas contra el cáncer. Por una parte, se ha intentado la introducción de un gene normal en las células somáticas anormales con el fin de corregir la deficiencia o el defecto de una proteína específica. A la fecha, existen ya más de cien estudios clínicos fases I-II, probando esta modalidad en diversas enfermedada-

des, pero principalmente en cáncer. Desafortunadamente, la transfección de células *in vivo* no siempre resulta una tarea sencilla y esto ha sido revisado con anterioridad.<sup>1</sup> En contraparte, pudiera bloquearse la transcripción y/o la traducción de una molécula específica que estuviera involucrada en la estimulación del crecimiento y/o en la inhibición de la muerte celular de las células cancerosas. Para estos fines podrían utilizarse compuestos de bajo peso molecular que pudieran alcanzar más fácilmente sus blancos dentro de las células y que pudieran sintetizarse en gran escala para su uso en humanos. A este tipo de moléculas se les ha denominado drogas informacionales.

Como su nombre lo indica, las drogas informacionales son moléculas sintéticas que portan la información biológica necesaria para actuar de manera específica sobre los genes involucrados en diversos fenómenos biológicos (por ejemplo: cancerización). Dentro de este nuevo tipo de drogas se incluyen derivados de oligonucleótidos (deoxi- o ribonucleótidos) que son diseñados para modular selectivamente la expresión genética de las células. Varias estrategias pueden ser utilizadas para este fin:

\* Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM. Apartado postal 70-243, México, D. F.

- Con oligodeoxicolectóidos antisentido, el oligoneucléotido es dirigido en contra de un RNA mensajero específico para inhibir la traducción de ese RNAm en la proteína correspondiente (esta estrategia será la única a discutir en el presente artículo).
- Utilizando ribozimas, con las cuales un oligoribonucleótido (RNA corto), puede ser diseñado para incluir la degradación de otro RNA específico.
- La estrategia antigene, en el que una secuencia de DNA de doble cadena dentro del núcleo es el blanco de un oligoneucléotido que, al unirse a esa secuencia, forma una triple hélice e inhibe específicamente la transcripción del gene que se encuentra localizado en ese fragmento de DNA.

## Oligodeoxinucleótidos antisentido

### *Mecanismos de acción y diseño*

Los oligoneucléotidos son secuencias cortas de oligodeoxiribonucleótidos (ODN), que son diseñadas para ser complementarios a secuencias específicas de RNA mensajero. Idealmente, la secuencia de RNAm que se desea bloquear debe codificar para una proteína relevante al proceso biológico en estudio, por ejemplo carcinogénesis, embriogénesis, angiogénesis, etc. En un inicio se pensó que la sola unión de los ODN con su secuencia blanco era suficiente para inhibir la traducción del RNAm. Sin embargo, se conoce en la actualidad que existen cuando menos dos mecanismos por medio de los cuales los ODN ejercen sus efectos biológicos.

- 1) El híbrido ODN-RNAm es un sustrato para la ribonucleasa endógena llamada RNasa H, la cual es capaz de reconocer híbridos de DNR-RNA y de degradar únicamente a la parte de RNA. De esta forma, el ODN permanece libre de daño y activo.
- 2) La unión del ODN a la región 5' no traducida de un RNAm es capaz de inhibir la unión y el deslizamiento del RNA por la subunidad ribosomal 40S y/o la asociación de factores proteicos que intervienen en la iniciación de la traducción.

Para el diseño de los ODN debe conocerse inicialmente una sola especie de RNAm de entre todas la población de RNAs mensajeros en células humanas. Por otro lado, es importante recordar que los ODN antisentido deben ser diseñados tan cortos como sea posible para incrementar su especificidad de unión a la secuencia blanco cuando es usado en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha calculado que la longitud mínima del ODN debe estar entre 11 y 25 bases (mers), dependiendo de su composición: 11 si sólo contiene Gs y Cs, 15, si contiene As y Ts (esta diferencia toma en cuenta la mayor proporción que existe de AT (60%) en el DNA humano con respecto al contenido de GC (40%). No obstante, en ocasiones es difícil obtener ODN eficiente de esos tamaños y entonces puede intentarse el uso de ODNs con mayor número de bases (por ejemplo hasta de 20 mers). La importancia de estos conceptos radica en que, a 37°C y bajo las condiciones iónicas prevaletes en los compartimentos intracelulares, un ODN corto puede tener mayor discriminación para unirse correctamente a su secuencia complementaria, aún ante la presencia de otra secuencia similar que contenga una mutación única.

### Modificaciones químicas

De esta manera sistemática se han reconocido varios problemas que limitan la actividad de los ODNs en diversos modelos experimentales (Cuadro I). De los más relevante están la permeabilidad celular, el secuestro vacuolar del ODN dentro del citosol y la degradación que estas moléculas sufren por nucleasas, tanto a nivel intracelular como extracelular. Por este motivo, muchos estudios se han dedicado a diseñar ODNs con modificaciones químicas que incrementen su incorporación a las células, su estabilidad química y su afinidad por el RNA. De las contribuciones más importantes ha sido la creación de ODNs con puente fosforotioato, porque esta modificación incrementa la resistencia de los ODNs a la degradación por nucleasas intra y extracelulares. Sin embargo, estudios preliminares con una nueva generación de ODNs fosforotioatos que también contienen 5°C propinilpirimidinas, no sólo han logrado incrementar la

estabilidad química, sino también la afinidad del ODN por el RNA y la potencia antisentido de moléculas muy pequeñas, por ejemplo de tan sólo 7 mers. Por ello, la relación costo/beneficio de estos nuevos ODNs pudiera disminuir significativamente. Finalmente, si el problema es la internalización de cualquier clase de ODNs, esto puede resolverse asociando estas moléculas a lípidos catiónicos (por ejemplo, lipofectin, GS-2888, ect).<sup>3</sup>

#### Cuadro I. Factores que limitan la función del ODN

Accesibilidad del banco  
Longitud y composición del ODN  
Permeabilidad celular  
Abundancia relativa del RNAm que se desea bloquear  
Secuestro en compartimentos intracelulares  
Estabilidad química y tasa de degradación del ODN  
Toxicidad

biología del desarrollo desea evaluar la actividad de una enzima determinada durante la embriogénesis, pues requerirá de que el efecto del ODN que se use sea realmente del tipo estrictamente antisentido para inhibir la síntesis de esa enzima y validar su importancia en dicho fenómeno. Por el contrario, a un oncólogo no le importaría tanto el que hubiese efectos mixtos del ODN en su modelo, sean antisentido y/o inespecíficos, siempre y cuando este oligodeoxinucleótido inhibiera el fenotipo maligno y/o indujera la muerte del tumor que estudia.

#### Cuadro II. Algunos efectos inespecíficos de los ODN

Unión inespecífica a la secuencia no complementaria de RNAm y a proteínas

Unión a diversos factores de transcripción (por ejemplo activación del SP 1)

Inhibición inespecífica de la infección viral

Inhibición de la adhesión celular por unión a proteínas de matriz extracelular

### Efectos de los ODNs y estudios clínicos

El efecto antisentido verdadero es aquel en el que el ODN se une específicamente a su secuencia complementaria de RNA, con la consiguiente activación de la RNAsa H y la inhibición de la traducción de dicha secuencia. Sin embargo, a pesar de que los efectos de múltiples ODNs han sido estudiados en numerosas células de mamífero *in vitro* e *in vivo*, muchos de estos efectos biológicos no han podido ser atribuidos a mecanismos antisentido exclusivamente (Cuadro II). La posibilidad de efectos inespecíficos por ODNs es bien conocida y ha sido motivo de una basta discusión en diversas publicaciones internacionales,<sup>4,5</sup> y en una conferencia reciente sobre "The Art of Antisense", auspiciada por Nature en EUA. En estos foros, los expertos han recalado la importancia de hacer el mayor número de controles posibles para validar el efecto de las moléculas ODN en el sistema que se estudie, pero también han reconocido que no existe una prueba infalible que valide inequívocamente el efecto antisentido.

Pero todo depende del objetivo de nuestros estudios. Por ejemplo, si alguien en el área de

En la actualidad, existen infinidad de modelos en que alguna de las características del fenotipo maligno es revertida al inhibir ciertos oncogenes con ODNs específicos. Por ejemplo, la proliferación y el crecimiento de células tumorales han sido bloqueados usando ODNs en contra de los siguientes endogenes: 1) K-ras en cáncer de pulmón de células pequeñas; 2) bcr-abl en leucemia mieloide crónica; 3) c-myc en linfomas; y 4) e-myb en adenocarcinoma de colon, entre otros modelos. En contraparte, si se bloquea la expresión de moléculas que supuestamente inhiben las metástasis tumorales como la L-caderina, entonces las líneas celulares se vuelven altamente metastásicas. Por esto no es de sorprender que diversos investigadores ya hayan puesto en marcha varios estudios clínicos para evaluar el potencial terapéutico de ODNs antisentido en diversas enfermedades humanas (Cuadro III).

Desafortunadamente, a la fecha no se conocen cuáles serán las consecuencias del uso crónico de

**Cuadro III. Lista parcial de los estudios clínicos con ODNs-antisentido**

Autor	Enfermedad	Efecto
C Iléléne	Cáncer de vejiga no infiltrante	Inhibición del oncogene Ha-ras
AM Gerwitz	Leucemia mielógena crónica (crisis blástica)	Inhibición del oncogene c-myb
Isis Pharmaceutical	Retinitis por CMV en SIDA	Bloquea reproducción de CMV
Isis Pharmaceutical Hybridon Inc	Verrugas genitales SIDA	Bloquear papilomavirus humano Bloquea la reproducción de HIV-1 por efecto anti-gag

estas moléculas en humanos y si es realidad tendrán un impacto terapéutico significativo. Tampoco se conoce en detalle el perfil de toxicidad de los ODNs en humanos y estos aspectos están en evaluación actualmente. Pero sí se sabe que en animales experimentales se han presentado eventos letales con la administración única de algunos ODNs fosforotioatos, sin conocerse la fisiopatología de los mismos. En otros ensayos, algunos ODNs han generado disminución de la fórmula blanca y cambios en la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Interesantemente, los fosforotioatos tienden a acumularse preferencialmente en la médula ósea, los riñones y el hígado de los animales. Por todas estas razones, los ensayos que se han iniciado en humanos han utilizado las dosis más bajas de estos compuestos que se administran lentamente por infusión venosa continua o durante el trasplante autólogo de médula ósea.

### Perspectivas

Estos hechos demuestran el poder de la tecnología antisentido y la aplicación potencial que pudiera tener en diversas áreas de la medicina. Sin embargo, es importante reconocer que aún te-

niendo el efecto deseado al usar un ODN, éste pudiera estar actuando por mecanismos totalmente inespecíficos que están o no relacionados a su actividad antisentido. Aún más, las nuevas modificaciones a los ODN fosforotioatos prometen mayor afinidad y estabilidad de estas moléculas con lo cual se espera un mejor efecto a menor costo. Pero solo el tiempo definirá el valor real de todas estas intervenciones que, por ahora, están impulsadas principalmente por la fuerza de mercado establecida por grandes compañías biotecnológicas y farmacéuticas.

### Referencias

1. **Gutiérrez AA et al.** Gene therapy for cancer. *The Lancet* 1992;339:715-721.
2. **Hélène C.** Antisense and antigene oligonucleotides targeted to oncogenes. En Workman p (ed): *New approaches in cancer pharmacology: drug design and development*. ESO Monographs. Springer Verlag, Berlin. 1992:13-21.
3. **Neckers LM.** Cellular internalization of oligodeoxynucleotides. En Wolf JA (ed) *Gene Therapeutics* Birkhäuser. Boston USA. 1994:180-182.
4. **Warner RW.** Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994;372:333-335.
5. **Gura T.** Antisense has growing pains *Science* 1995;207:575-477.