



Revisión

Inmunoterapia y terapia génica como nuevos tratamientos contra el cáncer

Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer

Martha Montserrat Rangel-Sosa¹, Estuardo Aguilar-Córdova², Augusto Rojas-Martínez³

¹ Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

² Advantagene, Auburndale, MA USA.

³ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Tecnológico de Monterrey. Monterrey, México.,

Rangel-Sosa MM, Aguilar-Córdova E, Rojas-Martínez A. Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer. *Colomb Med (Cali)*. 2017; 48(3): 137-46.

© 2017 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acreditan.

Historia

Recibido: 02 marzo 2017

Revisado: 17 abril 2017

Aceptado: 09 mayo 2017

Palabras clave:

Cáncer, inmunoterapia, anticuerpo monoclonal, células T reguladoras, terapia génica

Keywords:

Cancer, immunotherapy, monoclonal antibody, regulatory T cells, gene therapy

Resumen

El sistema inmune interactúa íntimamente con los tumores durante el proceso del desarrollo de la enfermedad y su progresión a metástasis. Esta compleja comunicación entre el sistema inmune y las células tumorales puede prevenir o promover el crecimiento del tumor. Los nuevos enfoques terapéuticos que aprovechan los mecanismos inmunológicos, ya sea por el bloqueo de señales inhibitorias o por la activación directa de células efectoras, han mostrado resultados prometedores. El bloqueo de puntos de control inmunológicos (immune-checkpoints) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores que normalmente inhiben el sistema inmune, como CTLA-4 o PD-1, ha resultado ser un tratamiento exitoso para pacientes con melanoma avanzado. El fármaco ipilimumab es un anticuerpo anti-CTLA-4 que ha demostrado buenos resultados terapéuticos en pacientes con melanoma. Por otro lado, la terapia génica también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos. En especial, la administración de la enzima timidina quinasa del virus Herpes simplex (HSV-TK) en combinación con el fármaco ganciclovir (GCV) ha mostrado ser una terapia suicida muy efectiva para la destrucción de diferentes neoplasias incluyendo glioblastomas y tumores prostáticos, por un mecanismo que involucra el reclutamiento de linfocitos infiltrantes de tumor. Es importante la búsqueda de nuevas estrategias o la combinación de terapias innovadoras, con el fin de involucrar tanto la atracción de linfocitos citotóxicos así como el empleo de moléculas que inhiban la inmunotolerancia del tejido tumoral para mejorar la eficiencia de los tratamientos contra el cáncer.

Abstract

The immune system interacts closely with tumors during the disease development and progression to metastasis. The complex communication between the immune system and the tumor cells can prevent or promote tumor growth. New therapeutic approaches harnessing protective immunological mechanisms have recently shown very promising results. This is performed by blocking inhibitory signals or by activating immunological effector cells directly. Immune checkpoint blockade with monoclonal antibodies directed against the inhibitory immune receptors CTLA-4 and PD-1 has emerged as a successful treatment approach for patients with advanced melanoma. Ipilimumab is an anti-CTLA-4 antibody which demonstrated good results when administered to patients with melanoma. Gene therapy has also shown promising results in clinical trials. Particularly, Herpes simplex virus (HSV)-mediated delivery of the HSV thymidine kinase (TK) gene to tumor cells in combination with ganciclovir (GCV) may provide an effective suicide gene therapy for destruction of glioblastomas, prostate tumors and other neoplasias by recruiting tumor-infiltrating lymphocytes into the tumor. The development of new treatment strategies or combination of available innovative therapies to improve cell cytotoxic T lymphocytes trafficking into the tumor mass and the production of inhibitory molecules blocking tumor tissue immune-tolerance are crucial to improve the efficacy of cancer therapy.

Autor de correspondencia:

Augusto Rojas-Martínez. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey. Av. Morones Prieto 3000 Pte., Monterrey, CP 64710, México. E-mail: arojamtz@gmail.com

Introducción

La progresión de muchos tipos de cáncer se acompaña de una fuerte supresión del sistema inmune (SI), lo que interfiere con la respuesta antitumoral y la erradicación eficaz del tumor¹. La evasión de la inmuno-vigilancia es atribuida, en parte, a que el microambiente tumoral puede inhibir la proliferación de linfocitos T y atraer a poblaciones celulares supresoras².

La mejor comprensión del sistema inmunológico del tumor ha permitido el desarrollo de terapias específicas diseñadas para mejorar la respuesta inmune de un paciente. La inmunoterapia tumoral tiene dos estrategias: atacar al tumor directamente o activar el SI usando terapias celulares, como la estimulación con agonistas o el bloqueo de puntos de control inmunológicos³. Este último libera el potencial de la respuesta inmune antitumoral, mostrando ser una terapia prometedora⁴. Otra opción antitumoral es el uso de modalidades de terapia génica, que permiten modificar la expresión génica con propósitos terapéuticos. Por ejemplo, ésta puede facilitar la transducción de células tumorales con “genes suicidas”, una de las estrategias de terapia génica antitumoral más investigadas⁵.

En este artículo se hace una revisión del uso de terapia génica suicida y el bloqueo de los puntos de control inmunológicos como alternativas para el tratamiento del cáncer y se analizan los posibles efectos sinérgicos que podrían lograrse con la combinación de estas dos terapias.

1. Cáncer y el sistema inmune

El SI interactúa íntimamente con los tumores durante el proceso del desarrollo de la enfermedad y su progresión a metástasis (inmunología tumoral)⁶. El SI responde al cáncer, reconociendo y eliminando las células anormales (inmuno-vigilancia)⁷. Sin embargo, algunas células resistentes escapan de este control (inmunoedición)⁸, disminuyendo su inmunogenicidad⁹, promoviendo el crecimiento maligno⁷.

Las células tumorales presentan cambios en sus marcadores de superficie. Por ejemplo, expresan antígenos asociados a tumor (TAA)¹⁰ o disminuyen la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Esto puede activar células de la respuesta inmune innata, como las células asesinas naturales (NK)¹⁰. Los macrófagos y neutrófilos atacan las células tumorales y estimulan a los linfocitos T citotóxicos (CTL), a las células presentadoras de antígeno (APC) y a las NK. En contraste, las células inflamatorias producen factores de crecimiento tumorales (TGF) y factores estimuladores de la angiogénesis que contribuyen al desarrollo del tumor¹¹.

En la respuesta adaptativa, los TAA procesados son presentados por moléculas MHC clase I y II de las APC a los receptores específicos para la activación de las células T CD8+ o CD4+, respectivamente^{10,12}. Los linfocitos T CD8+ son consideradas las principales células efectoras antitumorales¹³. Una vez que son activadas, median la lisis de las células cancerosas¹⁰. Dentro de las células T CD4+, las Th1 son responsables de la inmunidad celular: secretan interleucina (IL)-2, TNF α e interferón- γ (IFN- γ), promueven la actividad citotóxica de los macrófagos e inducen la sobreexpresión de MHC I y II en las APC. En contraste, las células Th2 expresan IL-4, -5, -10 y -13, induciendo anergia clonal, potenciando la inmunidad humoral y regulando la actividad de los macrófagos¹³. Por otro lado, los linfocitos T reguladores (Treg), ayudan a reducir la inflamación produciendo TGF- β , IL-35 e IL-10¹⁰. Las células tumorales pueden secretar quimiocinas como CCL22 para reclutar células Treg con el objetivo de suprimir la función efectora de las células T y disminuir la respuesta inmune¹⁰.

Los tumores también pueden desregular el SI alterando un complejo balance entre señales inhibitorias (puntos de control) y activadoras en diferentes vías que regulan la acción de las células T⁷.

2. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos Treg son relevantes para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica: mantienen la tolerancia a antígenos propios, evitan la aparición de enfermedades autoinmunes, controlan el desarrollo de una respuesta inmune y favorecen el escape de las células tumorales del control inmunológico^{14,15}. La subpoblación mejor caracterizada expresa CD4, CD25 y Foxp3. Las poblaciones celulares que son suprimidas por los linfocitos Treg incluyen a los linfocitos T CD4+ y CD8+, las células T naturales asesinas T (células NKT), las células dendríticas (DCs), los monocitos/macrófagos, los linfocitos B y las células NK¹⁴.

Debido a que los Treg suprimen la respuesta inmune contra antígenos propios^{8,16}, se postula que los TAAs pueden inducir un incremento en el número de linfocitos Treg intratumorales en varias neoplasias, incluyendo el cáncer colorrectal (CRC), facilitando la inmunotolerancia tumoral^{8,17}. La acumulación de Treg en tumores se explica por varios mecanismos, como la conversión de células T CD4+ a Treg en respuesta a TGF- β de membrana, el reclutamiento de Tregs por las quimiocinas CCL17, CCL22 y CCL28 o la secreción tumoral de VEGF-A en respuesta a la hipoxia, lo cual inhibe la maduración de DC. Las DC inmaduras expresan TGF- β favoreciendo la conversión de células T CD4+ a Treg¹⁸.

Los TAA más frecuentes son antígenos propios poco expresados en células normales, pero altamente expresados en las tumorales¹⁸. El antígeno carcinoembrionario (CEA) expresado altamente en CRC¹⁸, uno de los mejor conocidos, es reconocido como antígeno propio por los Tregs¹⁹, ocasionando una respuesta inmune deficiente frente a las células tumorales. En cánceres de ovario, mama, páncreas, estómago e hígado, un incremento de linfocitos Treg en el tumor se asocia a empeoramiento del pronóstico¹⁷. El uso de estas células como blanco puede impactar las estrategias terapéuticas contra el cáncer⁸.

2.1 Mecanismos de acción de los linfocitos Treg

Los linfocitos Treg tienen cuatro mecanismos principales de acción para regular la respuesta inmune (Fig. 1). El primero es la supresión por citocinas inhibitorias, las cuales incluyen IL-3, IL-10 y TGF β ^{18,20}. El segundo es la supresión por citólisis. Los Treg pueden tener inducir citólisis de las células B por medio de la producción de granzima B. Estas células también pueden ejercer un efecto citolítico en linfocitos T CD8+ y células NK mediado por granzima B y perforina, o por la vía aTRAIL-DR5^{20,22}. El tercero es la supresión por alteraciones metabólicas que afectan la actividad de moléculas como CD25 (receptor de IL-2), AMP cíclico (cAMP), CD39, CD73 y el receptor de adenosina 2A (A2AR)²⁰. El cuarto mecanismo consiste en la supresión de la maduración o de la función de DC. Esto incluye vías como la del gen 3 de activación de linfocitos (LAG3) o la interacción entre el antígeno asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y CD80/86, la cual induce a la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), una molécula inmunosupresora generada por las DC^{10,20}. El bloqueo de estos mecanismos inmunosupresores podría incrementar la función de las células T y generar una respuesta clínica más efectiva^{8,20}.

2.2 Regulación de los puntos de control inmunológicos por medio de linfocitos Treg

En el caso de las células T, la amplitud y calidad de la respuesta después del reconocimiento de un antígeno, está regulada por un balance entre señales coestimuladoras e inhibitorias (puntos de

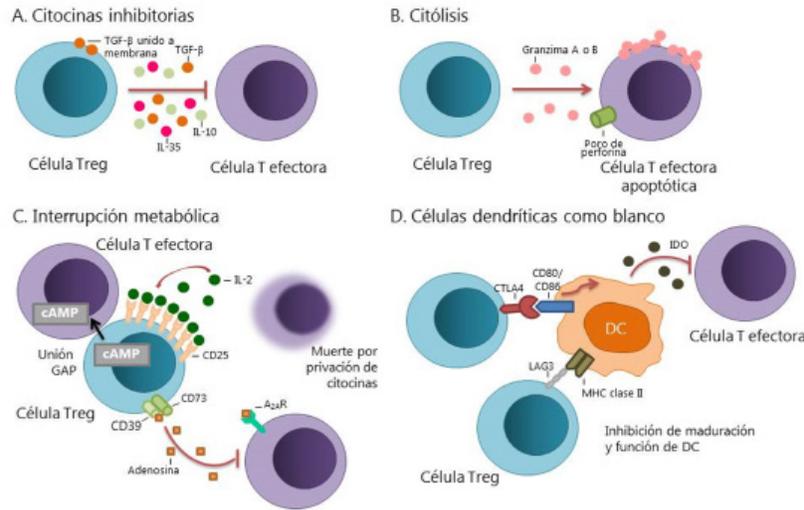


Figura 1. Mecanismos de acción de las células Treg. A. Producción de citocinas inhibitorias como IL-10, IL-35, y TGF-β. B. La inhibición por citólisis incluye mecanismos dependientes de granzima A o granzima B, así como dependientes de perforina. C. Se puede dar una interrupción metabólica por parte de las células Treg al sobreproducir CD25, capturando la IL-2; realizar una inhibición por cAMP o inmunosuprimir por medio del receptor de adenosina 2A. D. Se puede modular la maduración o función de las DC por medio de las vías LAG3, CTLA-4 o por la enzima IDO (Modificado de Vignali et al. 2008)³⁰.

control inmunológico)⁴. Con el objetivo de aumentar la función efectora de las células T infiltrantes de tumor, se pueden inhibir las señales inmunosupresoras; de esta manera, se ha tenido un mayor éxito clínico en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como melanoma y cáncer de pulmón⁶. Las moléculas que actúan como puntos de control inmunológico, como el receptor CTLA-4 y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), son expresadas en los linfocitos Treg y en las células T efectoras infiltrantes de tumor¹⁵.

2.3 Puntos de control inmunológico en cáncer

Como se comentó previamente, la activación e inhibición de diferentes receptores regula el balance entre la respuesta y la tolerancia inmune^{23,24}, siendo estos importantes para una

completa activación y función efectora de las células T²⁵. La terapia con anticuerpos contra reguladores inmunológicos negativos ha demostrado éxito en el tratamiento antineoplásico^{23,25}, debido a que aumenta el potencial de la respuesta inmune antitumoral. Está demostrado que los tumores usan algunas vías de control inmunológico como mecanismo de resistencia inmune⁴, ya que al incrementarse la expresión de las proteínas de los puntos de control, decrece la función de las células T. Ejemplos de puntos de control inmunológicos son PD-1, CTLA-4, LAG-3, inmunoglobulina de célula T (TIM-3), entre otros²⁶.

Los anticuerpos antitumorales que bloquean los puntos de control inmunológico están dirigidos contra receptores de linfocitos o sus ligandos²⁷ (Tabla 1). Dos puntos de control

Tabla 1. Desarrollo de agentes farmacológicos dirigidos contra vías de señalización de inmuno-checkpoints^{36,80}.

Blanco	Función biológica	Anticuerpo	Situación en clínica
CTLA-4	Receptor inhibitorio	Ipilimumab	Aprobado por la FDA para melanoma. Ensayos de fase IV para melanoma y cáncer metastásico de células renales. Ensayos de fase III para cáncer de estómago/esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma renal, mesotelioma pleural, carcinoma metastásico de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de próstata, melanoma ocular
		Tremelimumab	Probado en ensayos de fase III para melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células de pulmón pequeñas y no pequeñas, cáncer urotelial
		Nivolumab	F Aprobado por la FDA para melanoma, carcinoma renal, cáncer de células de pulmón no pequeñas. Ensayos de fase IV para carcinoma renal metastásico avanzado y melanoma metastásico. Ensayos fase III para cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, cáncer de estómago/esófago, melanoma, mesotelioma, carcinoma hepatocelular, mieloma múltiple, cáncer urotelial, cáncer gástrico
PD-1	Receptor inhibitorio	Pembrolizumab	Aprobado por la FDA para melanoma, cáncer de células de pulmón no pequeñas. Ensayos de fase III para melanoma y cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas.
		Pidilizumab	Ensayos de fase I/II para linfoma, mieloma múltiple, cáncer de páncreas.
		BMS-936559	Ensayos de fase I para melanoma.
PD-L1	Ligando de PD-1	Atezolizumab	Ensayos de fase III para cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, cáncer de mama triple negativo, cáncer de tracto urinario, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma.
		LAG3	Receptor inhibitorio
B7-H3	Ligando inhibitorio	Enoblituzumab	Ensayos de fase I para varios tipos de cáncer.

CTLA-4: antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos;
 LAG3: gen 3 de activación a linfocitos;
 PD-1: receptor proteico de muerte celular programada 1;
 PDL1: ligando de PD-1.

inmunológicos ampliamente estudiados en el contexto clínico de la inmunoterapia contra el cáncer son CTLA-4 y PD-1; ambos son receptores inhibitorios que regulan la respuesta inmune²⁷. Aunque la inhibición de los puntos de control parece ser exitosa en el tratamiento de algunos cánceres, está asociada eventos adversos, en particular a respuestas autoinmunes que afectan a órganos como el colon, la piel, algunas glándulas endócrinas, el hígado, etc²⁶.

2.4 CTLA-4

El receptor CTLA-4 es el primer punto de control inmunológico usado como blanco clínico²⁸. CTLA-4 es miembro de la súper-familia de las inmunoglobulinas CD28:B7, normalmente es expresado en bajos niveles en la superficie de las células T efectoras y células Treg. Su función es regular la amplitud de las primeras etapas de la activación de estas células²⁸. Para que una célula T se active se requieren tres señales: la unión del antígeno con el receptor de células T (TCR), la interacción del MHC (en humanos antígeno leucocitario humano, HLA) con los receptores CD8 o CD4 de las células T y la generación de una señal coestimuladora generada por la unión de CD80(B7) con CD28^{12,29}. Una vez que esto ocurre, la vía de CD28 amplifica la señalización del TCR para activar la proliferación de las células T. CD28 y CTLA-4 comparten los mismos ligandos: CD80(B7.1) y CD86(B7.2), aunque estos se unen a CTLA-4 con mayor afinidad^{4,30}, debido a esto, CTLA-4 contrarresta la actividad coestimuladora de CD28^{4,31}.

La importancia de CTLA-4 en la activación de células T está demostrada por el fenotipo letal del sistema inmune hiperactivado en ratones knockout para CTLA-4⁴. A pesar de que CTLA-4 se expresa en células efectoras T CD8+ activadas, su función fisiológica más importante se ejerce a través de distintos efectos en los dos subconjuntos principales de células T CD4+: la disminución de la actividad de las células T cooperadoras (Th1) y el potenciamiento de la actividad inmunosupresora de las células Treg⁴.

Se ha propuesto que la expresión de CTLA-4 atenúa la activación de las células T por una cascada de señales inhibitorias (Fig.

2), así como por su competencia con CD28³⁰. Algunos estudios sugieren que la activación de la proteína tirosina fosfatasa (SHP2) y de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) contrarrestan las señales de las quinasas inducidas por TCR y CD28³⁰. Otros mecanismos, incluyen la expansión de células Treg, estas producen citocinas inmunosupresoras como TGF-β y la enzima IDO³².

El bloqueo de CTLA-4 puede afectar la respuesta inmune intratumoral mediante la inactivación de los linfocitos Treg infiltrantes de tumor³³ y ocasionar un incremento en la respuesta inmune dependiente de células Th1⁴. También se ha observado que su bloqueo potencializa la producción de anticuerpos específicos contra TAA, así como una respuesta celular CD4+ y CD8+ antígeno específica²⁷.

2.5 PD-1

PD-1 también es una proteína clave en la regulación inmune²⁷, actúa como un punto de control inmunológico y es un blanco inmunoterapéutico. Es una molécula co-inhibitoria expresada en células T estimuladas, así como en los linfocitos Treg, células B-activadas y células NK^{27,31}. PD-1 parece tener una función crucial en la modulación de la actividad de las células T a través de la interacción con sus ligandos PD-L1 y PD-L2³¹. PD-L1 se expresa en tejidos linfoides y no linfoides, es activado especialmente en APCs, DCs, macrófagos y células B, aunque también se expresa en las células tumorales que abrogan la respuesta linfocitaria. La expresión de este ligando en el tejido tumoral es reconocida por los linfocitos T efectores, los cuales restringen su actividad oncolítica para inducir inmunotolerancia al cáncer²⁴. PD-L2 solo se expresa en las APCs²⁴.

Después de la unión con su ligando, PD-1 suprime la activación de células T reclutando SHP-2, la cual desfosforila e inactiva Zap70, un componente importante en la vía de señalización del TCR. Como resultado, PD-1 inhibe la proliferación de células T y sus funciones efectoras, como la producción de IFN-γ²⁴. El bloqueo de PD-1 puede mejorar las respuestas inmunes antineoplásicas al disminuir el número y actividad supresora de las células Treg

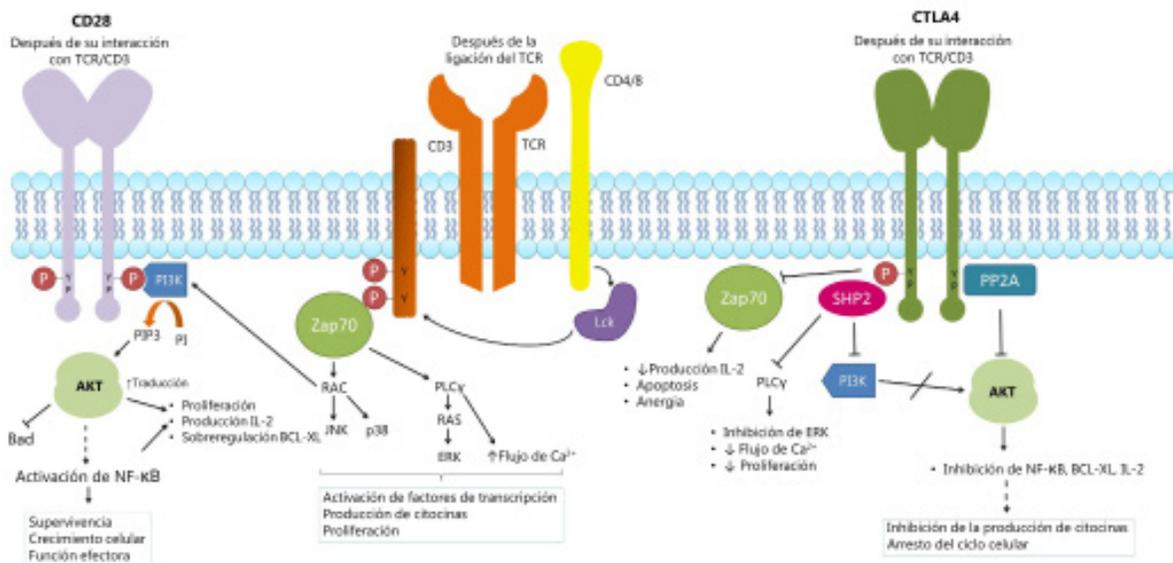


Figura 2. Modelo de señalización de CD28 y CTLA-4. A. Cuando ocurre la estimulación de células T, se fosforilan los residuos intracelulares de tirosina de CD28, esto atrae a la quinasa 3 fosfatidilinositol (PI3K). La activación de PI3K, la cual incluye la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) a fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3), puede promover la activación de la proteína quinasa B (PKB/Akt), seguida de la del factor nuclear-κB (NF-κB), resultando en la sobreexpresión del gen BCL-XL que favorece la supervivencia de las células T. La activación de Akt puede también promover la producción de interleucina 2 (IL-2). B. El complejo HLA-péptido es reconocido por el TCR y por su co-receptor CD4 o CD8, lo que activa a la quinasa Lck, la cual fosforila al complejo CD3. Esto ocasiona el reclutamiento y fosforilación de la proteína asociada a la cadena ζ (ZAP70), la cual inicia una cascada de señalización que activa la fosfolipasa γ1 (PLCγ1) y RAC. PLCγ1 promueve la movilización de calcio y la activación de la vía RAS. La combinación de estas cascadas de señalización promueve la activación de factores de transcripción y proliferación celular. C. CTLA-4 suprime la activación y la función de las células T mediante el reclutamiento de la proteína tirosina fosfatasa (SHP-2) y la proteína serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A). Estas fosfatasa desfosforilan varios de los puntos de señalización que son esenciales para la co-estimulación de las células T (Modificado de Alegre ML et al. 2001, Chen et al. 2013 & Nirschl et al. 2015)^{31,76,79}.

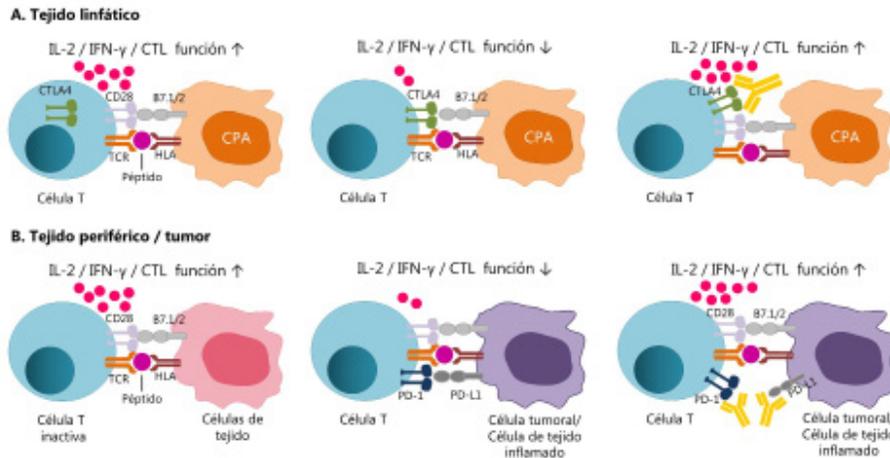


Figura 3. CTLA y PD-1 modulan diferentes aspectos de la respuesta de las células T. A) CTLA-4 es sobreexpresado después de la activación de una célula T virgen o de memoria en tejido linfático por el reconocimiento de un antígeno específico presentado en el contexto de HLA, ocasionando un decremento en la función efectora (fase de activación temprana). El bloqueo de CTLA-4 con un anticuerpo específico permitiría la vía señalización por el receptor CD28, contribuyendo a la proliferación y activación de células T. B) PD-1 es expresado principalmente en células T de memoria de tejidos periféricos, esta vía asegura la protección de los tejidos del daño colateral durante una respuesta inflamatoria. Las células tumorales sobreexpresan los receptores de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) para evadir la respuesta de las células T hacia el tumor. De la misma manera, al utilizar anticuerpos para bloquear la vía de PD-1 se contribuiría al desarrollo de una respuesta inmune más potente. (Modificada de Ott et al. 2013)³⁴.

intratumorales⁴, además de incrementar la proliferación de células T efectoras (CD8+/HLA-DR+/Ki67+células T), la producción del quimioatrayente alfa de células T inducible con interferón (I-TAC), de IFN- γ y de IL-18⁴.

2.6 Interacciones entre CTLA-4 y PD-1

Aunque CTLA-4 y PD-1 regulan de manera negativa la activación de las células T al bloquear la vía CD3/CD28, estos receptores tienen distintos papeles²⁷. CTLA-4 opera durante el inicio de la activación de las células T nativas y de memoria en tejido linfático y PD-1 opera durante la fase efectora de las células T (Fig. 3)^{27,34}. La interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 ocurre predominantemente en los tejidos periféricos, incluyendo el tejido tumoral^{15,27,34}.

Existen estudios preclínicos que proponen una terapia combinada utilizando anticuerpos para el bloqueo simultáneo de ambas vías (anti-CTLA-4 más anti-PD-1)¹². Esta estrategia dual potenciaría la respuesta antitumoral, pero también se puede prever que resulte más tóxica³⁵.

2.7 Uso clínico del bloqueo de puntos de control inmunológicos

El ipilimumab (anti-CTLA-4) es un anticuerpo monoclonal recombinante humano (inmunoglobulina IgG1 kappa) aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en el 2011 para el tratamiento de melanoma metastásico. El anticuerpo monoclonal humano nivolumab (anti-PD-1) es una inmunoglobulina IgG4 kappa autorizada en Japón en el 2014 para el tratamiento del melanoma no resecable. La FDA aprobó el anticuerpo monoclonal humanizado pembrolizumab (inmunoglobulina IgG4 kappa) contra PD-1 en septiembre de 2014 y el nivolumab en diciembre de 2014, ambos para el tratamiento de melanomas avanzados. En marzo del 2015 la FDA aprobó el nivolumab para el tratamiento de cáncer de pulmón³².

Existen estudios de fase II que muestran una mayor sobrevida en pacientes con melanoma metastásico a los que se les administró ipilimumab^{7,36}. En un estudio, se observó una sobrevida media de 10.1 meses en pacientes que usaron ipilimumab contra 6.4 meses en pacientes que usaron una vacuna peptídica control³⁶; también se observó una tasa de supervivencia en 5 años del

18.2% para pacientes con melanoma avanzado tratados con ipilimumab+dacarbazina contra el 8.8% de pacientes tratados con placebo+dacarbazina³⁷. Dos estudios fase III de nivolumab establecieron claros beneficios de este agente contra melanoma metastásico en comparación con la quimioterapia, mostrando una mejor tasa de supervivencia a un año³⁶. En julio del 2017, la compañía Bristol-Myers Squibb anunció que la FDA expandió el uso de ipilimumab administrado de manera intravenosa como tratamiento para melanoma metastásico no extirpable en pacientes pediátricos de 12 años de edad o mayores. Así mismo, en agosto del 2017, anunció que el nivolumab fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos (mayores de 12 años) con cáncer colorrectal metastásico que presentan alta inestabilidad microsatelital (MSI-H) o deficiencia en la reparación de errores en el DNA, en los pacientes refractarios al tratamiento con fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecan. El pembrolizumab y el nivolumab (aprobados por la FDA) fueron comparados contra el ipilimumab, demostrándose una mayor respuesta y una menor toxicidad³⁶. Además se observó que el bloqueo de PD-1 tuvo actividad en pacientes que no respondieron al bloqueo de CTLA-4³⁶. Se ha propuesto que los agentes que inhiben PD-1 son más efectivos que los que inhiben directamente a PD-L1 (ej. anticuerpo monoclonal humano BMS-936559³⁸, debido a que pueden inhibir ambos ligandos (PD-L1 y PD-L2) de manera simultánea³⁸.

En 2015 se evaluó la seguridad y eficiencia del nivolumab e ipilimumab por separado y en comparación con una terapia combinada nivolumab + ipilimumab (registrado como CheckMate 067 en ClinicalTrials.gov), observándose una sobrevida de 11.4 meses para el tratamiento combinado, contra con 6.9 meses para el tratamiento solo con nivolumab y 2.9 meses para el ipilimumab³⁹. Aunque se observa un aumento en la supervivencia de algunos meses, la inmunoterapia tiene un costo exorbitante; en el 2015 se estimó un costo promedio por mg de \$28.78 dólares para el nivolumab, \$51.79 dólares para el pembrolizumab y \$157.46 dólares para el ipilimumab. Hay que considerar que las dosis de administración van desde 2 mg/kg hasta 10 mg/kg cada 3 semanas, aproximadamente. Se calcula que el costo del tratamiento de un paciente con CheckMate 067 podría ser de \$295,566 dólares; el del nivolumab de \$103,220 dólares y del ipilimumab de \$158,252

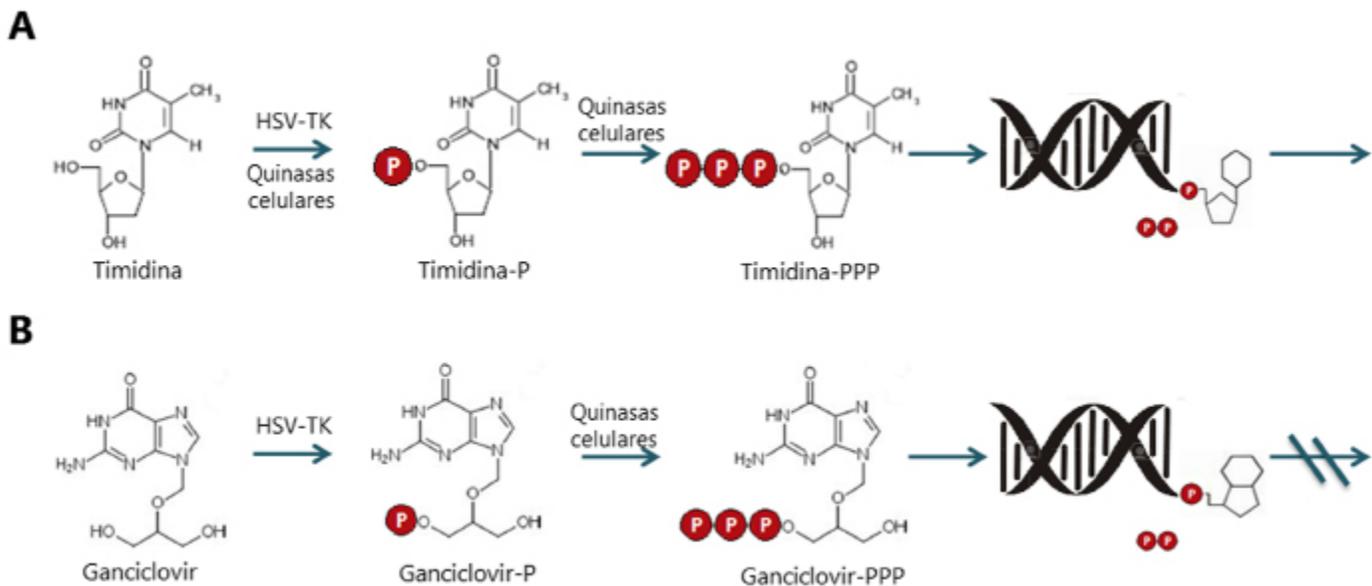


Figura 4. Metabolismo comparativo de la timidina y del ganciclovir por la timidina quinasa del virus Herpes simplex y las quinasas celulares. A. Metabolismo de la timidina. De manera normal, las enzimas timidina quinasa pueden fosforilar la timidina hasta obtener timidina trifosfato, para su posterior integración al DNA. B. Metabolismo del ganciclovir. La timidina quinasa del HSV, a diferencia de la timidina quinasa humana, es capaz de fosforilar el ganciclovir para convertirlo en GCV-P, una vez que esto ocurre, las quinasas celulares pueden fosforilarlo para su posterior integración en el DNA, esto ocasiona el arresto de su síntesis y por consiguiente, la muerte de la célula.

dólares. Teniendo en cuenta lo anterior, para un paciente de 75 kg con melanoma que recibe 26 de las dosis más altas y frecuentes de pembrolizumab, el costo del tratamiento sería de \$1,009,944 dólares. Si el tratamiento se le proporcionara a cada uno de los 589,430 pacientes que mueren por cáncer de melanoma anualmente, el costo para los sistemas de salud en general sería de \$173,881,850,000 dólares. Esto es simplemente insostenible. Como en muchas otras áreas de la farmacoeconomía de los medicamentos emergentes para las enfermedades crónicas, lo anterior representa un reto que debe resolverse considerando un equilibrio entre las demandas de la comunidad y de los sistemas de salud versus los intereses comerciales de los empresarios de las industrias farmacéuticas⁴⁰.

2.8 Efectos adversos

El uso de ipilimumab y tremelimumab se ha asociado con eventos adversos que afectan la piel (prurito, vitiligo), el intestino (diarrea y colitis), el hígado (hepatitis y enzimas hepáticas elevadas) y las glándulas endocrinas (hipotiroidismo, tiroidismo)³⁶. En comparación con el bloqueo de CTLA-4, el bloqueo de PD-1 o PD-L1 puede tener efectos similares, pero parecen ser menos comunes^{24,36}. Aunque se han mostrado buenos resultados en el uso de estas terapias, no son lo suficientemente efectivas para utilizarse solas³⁵, por lo que es necesaria su combinación con otras estrategias. La terapia génica podría ser una alternativa interesante para una terapia combinada.

3. Terapia génica suicida

La selectividad terapéutica de los agentes antineoplásicos es limitada, porque las células cancerosas son resistentes a la apoptosis, al arresto del ciclo celular y a la senescencia, además que pueden emerger subpoblaciones celulares resistentes⁴¹. La aplicación de tecnologías de terapia génica podría mejorar la selectividad de las terapias dirigidas a los puntos de control inmunológico y facilitar el acceso de estas al tejido tumoral⁴². La terapia suicida tiene dos alternativas: la terapia génica tóxica, en la cual se transducen genes para una proteína tóxica en las células tumorales, o la terapia de activación enzimática de profármacos. Esta última consta de dos etapas: inicialmente, el gen de una enzima heteróloga es dirigido y entregado al tumor para su expresión. Posteriormente, se

administra un profármaco que es convertido en un medicamento citotóxico por la enzima heteróloga⁴³. Debido a su mecanismo de acción, esta terapia confiere una inmunorreactividad antitumoral, como se explicará más adelante.

El sistema HSV-TK/GCV es selectivo para las células tumorales debido a que afecta la replicación activa del DNA de manera preferencial en las células tumorales, actividad que es baja en las células estromales circundantes, muchas de las cuales están en estado quiescente^{42,43}.

3.1 Enzimas y profármacos usados en sistemas de terapia génica suicida

Las enzimas utilizadas en terapia génica suicida se dividen en dos grupos. El primero comprende enzimas de origen no mamífero (ej. timidina quinasa del virus *Herpes simplex* [HSV-TK]). El segundo comprende enzimas de origen humano que están ausentes o se expresan a bajas concentraciones en células tumorales⁴³. Se han desarrollado varios sistemas enzima-profármaco para terapia génica suicida, como los sistemas carboxil esterasa (CE)/irinotecan, carboxipeptidasa A (CPA)/péptidos MTX-a, carboxipeptidasa G2(CPG2)/CMDA y HSV-TK/ganciclovir (GCV). Este último sistema es el más estudiado y ha progresado exitosamente a ensayos clínicos de fases avanzadas, por lo cual se explica con más detalle a continuación^{42,44}.

3.2 Sistema HSV-TK/GCV

El sistema HSV-TK/GCV utiliza al ganciclovir y sus análogos como profármacos. Estos profármacos son análogos de los nucleósidos de purina^{5,42}. La administración sistémica del GCV induce apoptosis selectiva en las células transducidas con el gen TK. La HSV-TK es capaz de fosforilar el GCV, convirtiéndolo en GCV monofosforilado, que posteriormente es tri-fosforilado por quinasas celulares. Este producto bloquea la replicación del DNA, causando además su fragmentación y apoptosis^{45,46} (Fig. 4).

El sistema HSV-TK/GCV se ha ensayado en estudios pre-clínicos^{47,48} y clínicos contra varios tipos de cáncer, como tumores de próstata^{49,50}, cerebro⁵¹⁻⁵³, ovario^{54,55}, vejiga^{56,57}, cuello uterino⁵⁸, páncreas^{59,60} y

hepático⁶¹, entre otros. Numerosos ensayos clínicos de fase I y II han probado la seguridad y eficacia de esta terapia en humanos^{43,44}. Diversos estudios demostraron que la transducción del gen *HSV-TK* es más segura y efectiva con vectores adenovirales de replicación deficiente en comparación con los vectores retrovirales^{51,62}.

3.3 Respuesta inmune inducida por el sistema AdV-TK/GCV.

Se ha evidenciado que la terapia con HSV-TK/GCV induce inmunidad anti-tumoral^{63,64} e incluso, regresión de tumores cerebrales en ratas inmunocompetentes y de neuroblastoma en un modelo murino^{65,66}. En los tumores tratados se observa una marcada infiltración de células inflamatorias, con predominio de CD4+ y CD8+, lo que sugiere que el sistema HSV-TK/GCV estimula la respuesta inmune antitumoral^{50,60}. También se observa la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2, moléculas de adhesión intracelular (ICAM) y moléculas del MHC en los tumores, y la atracción y activación de APCs^{67,68}.

Durante el tratamiento de tumores con HSV-TK/GCV, se incrementan las citocinas que estimulan a las APCs y a las células T, como IL-2, IL-12, IFN γ , TNF α y GM-CSF, mientras que las citocinas inhibitorias IL-4, IL-6 e IL-10 no se estimulan⁶⁷. El incremento en la respuesta inmune ha sido demostrado por niveles más altos de células CD8 circulantes activas y por la elevación de IL-12 en suero^{69,70}, un mediador clave en la respuesta inmune celular contra infecciones virales y tumores malignos^{69,71}. Los niveles de células NK se han relacionado con los niveles de IL-12, debido a que las células NK son uno de los blancos de acción de esta interleucina^{69,72}.

Adicionalmente, la proteína TK viral funciona como un súper-antígeno, estimulando un microambiente tumoral altamente inmunogénico⁶⁸. Esta proteína induce la liberación y presentación de TAAs que pueden ser reconocidos por los linfocitos T y generar una respuesta inmune adaptativa que también conduce a la citólisis de células tumorales y reclutamiento de APCs⁶⁸. Las APCs activadas inducen la proliferación de células T por la secreción de IL-2 e IL-12 en el sitio del tumor. Todos estos eventos son deseables para conseguir un potente efecto anti-tumoral^{73,74}. Sin embargo, debe considerarse una observación que resulta contradictoria. Un ensayo clínico de terapia neoadyuvante con HSV-TK/GCV para carcinoma pancreático mediada por un vector adenoviral, mostró niveles intratumorales incrementados de PD-L1 en especímenes analizados después de la resección quirúrgica. Este evento puede disminuir la respuesta de las células T efectoras, pero puede revertirse con la co-administración de inhibidores de PD-1/PD-L1⁶⁰.

Los ensayos clínicos en los que se ha probado la terapia con HSV-TK/GCV mediada por vectores virales de manera única o en combinación con agentes quimioterapéuticos o radioterapia para cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, o glioblastoma multiforme han mostrado progresos sólidos hasta fase III^{67,68,75}.

3.4 Efectos adversos

A pesar de los resultados prometedores, existen algunas desventajas. Los vectores adenovirales deficientes en replicación disparan una fuerte respuesta inmune humoral y celular que limita su duración a un periodo de entre dos o tres semanas. A pesar de esto, estos vectores pueden resultar útiles para aplicaciones terapéuticas en los que un nivel muy alto de expresión transitoria del gen terapéutico es deseable, como ocurriría en la terapia génica del cáncer⁷⁶. Por otro lado, la expresión de la proteína TK no es específica de tumor. Una opción interesante es el uso de adenovirus que prefieran su replicación en células tumorales usando un promotor específico⁷⁵. En estudios en fase I y II se han mostrado algunos efectos

secundarios, como fiebre leve, neutropenia, dolor de cabeza, trombocitopenia, alteración de las enzimas hepáticas, entre otros. Afortunadamente, estos eventos son transitorios y fáciles de tolerar^{49,51,62}.

4. Combinación de terapias como nuevo tratamiento

El tratamiento combinado de terapia génica e inmunoterapia es una opción atractiva posibilitada por los avances recientes en la terapéutica del cáncer. El empleo de un sistema de terapia génica suicida determinaría la presentación súbita y masiva de TAAs por un periodo sostenido de semanas o meses. Resulta razonable pensar que esta terapia pueda ser reforzada de manera sinérgica mediante su combinación con un fármaco inhibidor de puntos de control inmunológico administrado de manera sistémica como los descritos en esta revisión. Para ejemplificar más esta idea, se podría suponer que un tumor tratado con HSV-TK/GCV generara la exposición súbita y masiva de TAAs al sistema inmune, los cuales en otras condiciones no generan una inmunoreactividad efectiva por la disminución de MCH I y de moléculas de coestimulación y por la inducción de Treg. Este evento desencadenaría la atracción y activación de las APC y se podría esperar que algunos TAAs induzcan un incremento en el número de linfocitos Treg intratumorales (incluso antes de la intervención con terapia génica), propiciándose un ambiente inmunosupresor. Para prevenir este fenómeno inmunológico y reforzar la respuesta antitumoral, la subsiguiente administración de un inhibidor de punto de control inmunológico, por ejemplo un anticuerpo anti-PD1, afectaría la actividad de las células Treg intratumorales, lo que conduciría a un incremento en la proliferación de las células T efectoras capaces de combatir al tumor y reforzaría una respuesta de memoria inmunológica que potencialmente tendría un efecto protector de largo plazo³⁶.

Recientemente se ensayó un vector adenoviral portando el gen *HSV-TK* y la secuencia del dominio extracelular de PD-1 fusionada a la porción Fc de la IgG2a de ratón, para producir el segmento PD-1 soluble (sPD1-Ig), que inhibe la actividad del ligando completo de manera competitiva, y por consecuencia, inhibe el efecto apoptótico de las células T mediado por la interacción inmunosupresora del ligando íntegro con su receptor. Éste se administró en un modelo murino de carcinoma de colon y demostró una sinergia entre la terapia HSV/TK y el bloqueo competitivo de la unión PD1/PD-L1. Hubo un decremento significativo en el volumen tumoral en el grupo de ratones tratados con HSV-TK/sPD1 en comparación con los grupos controles, incluyendo el grupo de ratones tratados con el esquema simple HSV-TK/GCV⁷⁷.

Es posible que en un futuro cercano se continúen realizando ensayos preclínicos y clínicos que prueben hipótesis similares a la que se plantea en este apartado y que seguramente tendrán resultados clínicos muy efectivos, y sobre todo, con un alto nivel de selectividad terapéutica, lo cual favorecerá aún más el desarrollo de la medicina de precisión en el área de la oncología.

Conclusión

La potencialización de la respuesta inmune contra los tumores podría ser una estrategia clave para combatir el cáncer. El sistema TK/GCV induce la presentación masiva de TAAs de manera efectiva. Por otra parte, la expresión del súper-antígeno TK facilita la inmunidad celular antitumoral. El uso de anticuerpos monoclonales contra puntos de control de la respuesta inmune, como CTLA-4 y PD-1, contrarrestan la inmunosupresión ocasionada por el tumor. Hasta ahora ambas estrategias se encuentran en ensayos clínicos y han demostrado resultados

prometedores. Se esperaría que la combinación de estos dos tipos de terapias fuera sinérgica, más selectiva y efectiva y que tuviera un efecto protector de largo plazo.

Conflicto de intereses: No hay

Referencias

- Dzivenu OK, O'Donnell TJ. Cancer and the immune system: the vital connection. Cancer Research Institute: New York; 2003. Accessed: 30 September 2016. Available from: <https://www.cancerresearch.org/patients/answers-and-support/vital-connection>.
- Finn O. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012; 23(Suppl 8): viii6-9.
- Sathyanarayanan V, Neelapu S. Cancer immunotherapy: Strategies for personalization and combinatorial approaches. *Mol Oncol*. 2015; 9(10): 2043-53.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4): 252-64.
- Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther*. 2014; 2: 27.
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, *et al*. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015; 35 (Suppl): S185-98.
- Pennock GK, Chow LQ. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*. 2015; 20(7): 812-22.
- Jacobs J, Smits E, Lardon F, Pauwels P, Deschoolmeester V. Immune checkpoint modulation in colorectal cancer: What's new and what to expect. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 158038.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014; 27: 16-25.
- Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The immune system in cancer pathogenesis: Potential therapeutic approaches. *J Immunol Res*. 2016; 2016:4273943.
- Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.
- Messerschmidt JL, Prendergast GC, Messerschmidt GL. How cancers escape immune destruction and mechanisms of action for the new significantly active immune therapies: Helping nonimmunologists decipher recent advances. *Oncologist*. 2016; 21(2): 233-43.
- Palucka AK, Coussens LM. The basis of oncoimmunology. *Cell*. 2016; 164(6): 1233-47.
- Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(4): 295-07.
- Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*. 2016; 28(8): 401-09.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014; 27: 1-7.
- Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: The role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol*. 2013; 171(1): 36-45.
- Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, *et al*. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(14): 3738-50.
- Amin M, Lockhart AC. The potential role of immunotherapy to treat colorectal cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015; 24(3): 329-44.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7): 523-32.
- Guzmán-Flores JM, Portales-Pérez DP. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gac Med Mex*. 2013; 149: 630-8.
- Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14: 2076-84.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2015; 33(17): 1974-82.
- Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci*. 2017; 24(1): 26.
- Ceera S, Nowak EC, Burns CM, Noelle RJ. Immune checkpoint receptors in regulating immune reactivity in rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16: 469.
- Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*. 2017; 47(5):765-779.
- Yuan J, Hegde PS, Clynes R, Foukas PG, Harari A, Kleen TO, *et al*. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2016; 4:3-3.
- Wolchok JD, Saenger Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist*. 2008; 13(Suppl 14): 2-9.
- Gelao L, Criscitiello C, Esposito A, Goldhirsch A, Curigliano G. Immune checkpoint blockade in cancer treatment: A double-edged sword cross-targeting the host as an "Innocent bystander". *Toxins*. 2014; 6(3): 914-33.
- Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunol*. 2013; 13:5.

31. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(3): 220-28.
32. Pico YC, Choudhury A, Kiessling R. Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. *Trends Mol Med.* 2015; 21(8): 482-91.
33. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015; 27(4): 450-61.
34. Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PDL1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(19): 524-35.
35. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39(1): 98-106.
36. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity.* 2016; 44(5): 1069-78.
37. Maio M, Grob JJ, Aamdal S, Bondarenko I, Robert C, Thomas L, *et al.* Five-year survival rates for treatment-naive patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *J Clin Oncol.* 2015; 33(10): 1191-6.
38. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol.* 2016; 21: 462-73.
39. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 373(13): 1270-1.
40. Andrews A. Treating with checkpoint inhibitor. Figure \$1 million per patient. *Am Health Drug Benefits.* 2015; 8: 9.
41. Blagosklonny MV. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene.* 2004; 23(16): 2967-75.
42. Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 99(Pt A): 113-128.
43. Wirth T, Yla-Herttuala S. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines.* 2014; 2(2): 149-62
44. Rooseboom M, Commandeur JN, Vermeulen NP. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(1): 53-02.
45. Smee DF, Martin JC, Verheyden JP, and Matthews TR. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23(5): 676-82.
46. Ingemarsdotter CK, Poddar C, Mercier C, Patzel V, Lever AM. Expression of Herpes Simplex Virus thymidine kinase/ganciclovir by RNA trans-splicing induces selective killing of HIV-producing cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 7: 140-154.
47. Rojas-Martinez A, Wyde PR, Montgomery CA, Chen SH, Woo SL, Aguilar-Cordova E. Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1A-deficient adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat. *Cancer Gene Ther.* 1998; 5(6): 365-70.
48. Duarte S, Carle G, Faneca H, de Lima MC, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now?. *Cancer Lett.* 2012; 324(2): 160-70.
49. Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, Woo S, Timme TL, *et al.* In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther.* 1999; 10(7): 1239-49.
50. Rojas-Martínez A, Manzanera AG, Sukin SW, Esteban-María J, González-Guerrero JF, Gomez-Guerra L, *et al.* Intraprostatic distribution and long term follow-up after AdV-tk + prodrug as neoadjuvant to surgery in patients with prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20(11): 642-49.
51. Trask TW, Trask RP, Aguilar-Córdova E, Shine HD, Wyde PR, Goodman JC, *et al.* Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with recurrent malignant brain tumors. *Mol Ther.* 2000; 1(2): 195-03.
52. Zhao F, Tian J, An L, Yang K. Prognostic utility of gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase for patients with high-grade malignant gliomas: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol.* 2014; 118(2): 239-46.
53. de Melo SM, Bittencourt S, Ferrazoli EG, da Silva CS, da Cunha FF, da Silva FH, *et al.* The anti-tumor effects of adipose tissue mesenchymal stem cell transduced with HSV-TK gene on U-87-driven brain tumor. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0128922.
54. Hasenburg A, Fischer DC, Tong XW, Rojas-Martínez A, Nyberg-Hoffman C, Orłowska-Volk M, *et al.* Histologic and immunohistochemical analysis of tissue response to adenovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene therapy of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2002; 12(1): 66-73.
55. Rawlinson JW, Vaden K, Hunsaker J, Miller DF, Nephew KP. Adenoviral-delivered HE4-HSV-tk sensitizes ovarian cancer cells to ganciclovir. *Gene Ther Mol Biol.* 2013; 15: 120-130.
56. Tang W, He Y, Zhou S, Ma Y, Liu G. A novel Bifidobacterium infantis-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28(1): 155.
57. Pan JG, Luo RQ, Zhou X, Han RF, Zeng GW. Potent antitumor activity of the combination of HSV-TK and endostatin by adeno-associated virus vector for bladder cancer in vivo. *Clin Lab.* 2013; 59(9-10): 1147-58.
58. Chen D, Tang Q. An experimental study on cervix cancer with combination of HSV-TK/GCV suicide gene therapy system and Co radiotherapy. *BMC Cancer.* 2010; 10: 609-20.
59. Abate DD, García LR, Sumoy L, Fillat C. Cell cycle control pathways act as conditioning factors for TK/GCV sensitivity in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(10): 1175-85.
60. Aguilar LK, Shirley LA, Chung VM, Marsh CL, Walker J, Coyle W, *et al.* Gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgery or chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64(6): 727-36.
61. Zhu R, Chen D, Lin D, Lu F, Yin J, Li N. Adenovirus vector-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene/ganciclovir system exhibits anti-tumor effects in an orthotopic hepatocellular carcinoma model. *Pharmazie.* 2014; 69(7): 547-52.

62. Ji N, Weng D, Liu C, Gu Z, Chen S, Guo Y, *et al.* Adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase administration improves outcome of recurrent high-grade glioma. *Oncotarget* 2016; 7(4): 4369-4378.
63. Hassan W, Sanford MA, Woo SL, Chen SH, Hall SJ. Prospects for herpes-simplex-virus thymidine-kinase and cytokine gene transduction as immunomodulatory gene therapy for prostate cancer. *World J Urol.* 2000; 18(2): 130-35.
64. Kubo M, Satoh T, Tabata KI, Tsumura H, Iwamura M, Baba S, *et al.* Enhanced central memory cluster of differentiation 8+ and tumor antigen-specific T cells in prostate cancer patients receiving repeated in situ adenovirus-mediated suicide gene therapy. *Mol Clin Oncol.* 2015; 3(3): 515-21.
65. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage, FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(10): 348-52.
66. Cho HS, Lee HR, Kim MK. Bystander-mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene. *J Korean Med Sci.* 2004; 19(1): 107-12.
67. Aguilar LK, Guzik BW, Aguilar-Cordova E. Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development. *J Cell Biochem.* 2011; 112: 1969-77.
68. Wheeler LA, Manzanera AG, Bell SD, Cavaliere R, McGregor JM, Greco JC, *et al.* Phase II multicenter study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgical resection for newly diagnosed malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2016; 18(8): 1137-45.
69. Ayala G, Satoh T, Li R, Shalev M, Gdor Y, Aguilar-Cordova E, *et al.* Biological response determinants in HSV-tk + ganciclovir gene therapy for prostate cancer. *Mol Ther.* 2006; 13(4): 716-28.
70. Gregory SM, Nazir SA, Metcalf JP. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol.* 2011; 6(3): 357-74.
71. Higashi K, Hazama S, Araki A, Yoshimura K, Iizuka N, Yoshino S, *et al.* A novel cancer vaccine strategy with combined IL-18 and HSV-TK gene therapy driven by the hTERT promoter in a murine colorectal cancer model. *Int J Oncol.* 2014; 45(4): 1412-20.
72. Boieri M, Ulvmoen A, Sudworth A, Lendrem C, Collin M, Dickinson AM, *et al.* IL-12, IL-15, and IL-18 pre-activated NK cells target resistant T cell acute lymphoblastic leukemia and delay leukemia development in vivo. *Oncoimmunology.* 2017; 6(3): e1274478.
73. Vile RG, Castleden S, Marshall J, Camplejohn R, Upton C, Chong H. Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *Int J Cancer.* 1997; 71(2): 267-74.
74. Satoh T, Irie A, Egawa S, Baba S. In situ gene therapy for prostate cancer. *Curr Gene Ther.* 2005; 5(1): 111-9.
75. Gao Q, Chen C, Ji T, Wu P, Han Z, Fang H, *et al.* A systematic comparison of the anti-tumour activity and toxicity of the three Adv-T Ks. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94050.
76. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003; 4: 346-58
77. Shin SP, Seo HH, Shin JH, Park HB, Lim DP, Eom HS, *et al.* Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response. *Mol Ther.* 2013; 21(3): 688-95.
78. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(4): 227-42.
79. Nirschl CJ, Drake CG. Molecular pathways: co-expression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(18): 4917-24.
80. ClinicalTrials.gov. Disponible en <http://clinicaltrials.gov>. 2017. Accessed: Abril 2017.