

*Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.*

# Aceptabilidad de los sustratos celulares para la producción de sustancias biológicas

---

Informe de un  
Grupo de Estudio de la OMS

Organización Mundial de la Salud  
Serie de Informes Técnicos  
747



Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1987

ISBN 92 4 320747 4

© Organización Mundial de la Salud 1987

Las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones sobre reproducción de originales del Protocolo de la Convención Universal sobre Derecho de Autor. Las entidades interesadas en reproducir o traducir en todo o en parte alguna publicación de la OMS deberán solicitar la oportuna autorización de la Oficina de Publicaciones, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. La Organización Mundial de la Salud dará a esas solicitudes consideración muy favorable.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales en ciertos productos no implica que la Organización Mundial de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las marcas registradas de artículos o productos de esta naturaleza se distinguen en las publicaciones de la OMS por una letra inicial mayúscula.

ISSN 0509-2507

PRINTED IN SPAIN

87/7225 - Gráficas Reunidas - 2000

## INDICE

	Página
1. Antecedentes e introducción.....	5
2. Asuntos considerados por el Grupo de Estudio .....	7
3. Discusión y conclusiones .....	8
3.1 Evaluación del riesgo en las actividades de investigación y desarrollo...	9
3.2 Productos fabricados con otros métodos .....	11
3.3 Posibles riesgos de las sustancias biológicas producidas en líneas celulares continuas .....	11
3.4 Conclusiones generales.....	16
4. Recomendaciones .....	18
5. Nota de agradecimiento.....	18
Anexo 1. DNA contaminante heterogéneo.....	20
Anexo 2. Proteínas transformadoras.....	26

## GRUPO DE ESTUDIO DE LA OMS EN SUSTANCIAS BIOLÓGICAS

Ginebra, 18-19 de noviembre de 1986

### *Miembros*

- Profesor G. L. Ada, Jefe, Departamento de Microbiología, Escuela John Curtin de Investigaciones Médicas, Universidad Nacional de Australia, Canberra, Australia (*Relator*)
- Dr. J. Chermann, Instituto Pasteur, París, Francia
- Dr. M. G. Deo, Director, Centro de Investigaciones sobre el Cáncer, Bombay, India
- Profesor M. A. Epstein, Hospital John Radcliffe, Oxford, Inglaterra
- Profesor H. Harris, Jefe, Escuela de Patología Sir William Dunn, Oxford, Inglaterra
- Dr. H. Koprowski, Director, Instituto Wistar, Filadelfia, PA, Estados Unidos de América
- Dr. B. A. Laskevic, Director Adjunto, Instituto de Poliomiélitis y Encefalitis Víricas, Moscú, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
- Dr. D. R. Lowy, Jefe, Laboratorio de Oncología Celular, Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD, Estados Unidos de América
- Dr. M. A. Martin, Jefe, Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Bethesda, MD, Estados Unidos de América
- Profesor T. Matuhasi, Instituto Conmemorativo Okinaka de Investigaciones Médicas, Tokyo, Japón
- Dr. C. Morel, Director, Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil
- Dr. F. Robbins, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, Estados Unidos de América (*Presidente*)
- Dr. R. Sager, Instituto de Cáncer Dana-Farber, Boston, MA, Estados Unidos de América
- Dr. C. R. Steinman, Departamento de Medicina, Universidad del Estado de Nueva York, Nueva York, NY, Estados Unidos de América
- Profesor K. Takatsuki, Universidad de Kumamoto, Kumamoto, Japón
- Profesor A. J. van der Eb, Laboratorio Sylvius, Leiden, Países Bajos
- Dr. Wu Min, Instituto de Cáncer, Academia China de Ciencias Médicas, Beijing, China
- Dr. D. Zewdie, Instituto Nacional de Investigaciones de Salud, Addis Abeba, Etiopía (*Vicepresidente*)
- Dr. H. zur Hausen, Centro Alemán de Investigaciones sobre el Cáncer, Heidelberg, República Federal de Alemania

### *Secretaría*

- Dr. J. Doehmer, Trinity College, Dublín, Irlanda (*Asesor temporero*)
- Dr. A. J. Kingsman, Universidad de Oxford, Oxford, Inglaterra (*Asesor temporero*)
- Dr. M. P. Moyer, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas, San Antonio, TX, Estados Unidos de América (*Asesor temporero*)
- Dr. J. C. Petriccioni, Jefe, Sección de Sustancias Biológicas, OMS, Ginebra, Suiza (*Secretario*)
- Dr. A. J. Strain, Departamento de Pediatría, Universidad de Sheffield, Inglaterra (*Asesor temporero*)

# **ACEPTABILIDAD DE LOS SUSTRATOS CELULARES PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAS**

## **Informe de un Grupo de Estudio de la OMS en Sustancias Biológicas**

Los días 18 y 19 de noviembre de 1986 se reunió en Ginebra un Grupo de Estudio de la OMS en Sustancias Biológicas. Inauguró la reunión en nombre del Director General el Dr. S. Litvinov, Subdirector General.

### **1. ANTECEDENTES E INTRODUCCION**

La aceptabilidad de los sustratos celulares para la producción de vacunas ha sido un tema polémico desde los años cincuenta, cuando se determinó que los cultivos de células primarias de primates no humanos eran aceptables para producir ciertas vacunas, como la anti-poliomielítica. Esa decisión sentó un gran precedente que ha tenido profundas repercusiones en la consideración de distintos sistemas celulares. Por ejemplo, transcurrió un decenio o más antes de que ciertas autoridades nacionales de control aceptaran los sustratos de células diploides humanas, pese a que todas las pruebas científicas confirmaban la inocuidad de los productos derivados de aquéllos.

El asunto de la aceptabilidad de los sustratos distintos de los preparados de células primarias y diploides volvió a considerarse en 1978 en Lake Placid, Estados Unidos de América, cuando se propuso el empleo de células linfoides humanas (obtenidas de linfomas) como fuente de interferón alfa. La principal razón para considerar una célula maligna humana como sustrato para la producción de interferón era que el producto podía prepararse en grandes cantidades y, de esa forma, el proceso de fabricación permitía eliminar los contaminantes celulares que podrían convertirse en motivo de preocupación. Esta actividad de investigación y desarrollo sentó la base de varios métodos de posible utilidad para garantizar la inocuidad de

los productos preparados a partir de varios otros linajes celulares continuos.

A medida que se lograron adelantos en las investigaciones biológicas básicas en los últimos diez años y que se reconoció a todas luces que las técnicas de DNA recombinante ofrecerían una oportunidad para preparar productos biológicos que hasta ahora no había sido posible fabricar, la utilidad de las líneas celulares continuas como substratos se convirtió en un hecho aparente. La introducción de la tecnología de hibridoma también avivó el interés en el empleo de dichas líneas. Como resultado, se celebró en Europa y en América del Norte una serie de reuniones para explorar más el tema. Varios grupos prepararon productos de distintas líneas celulares para ensayos clínicos y algunas autoridades nacionales de control comenzaron a aprobar el uso experimental de los mismos. En época más reciente, las autoridades nacionales de control han concedido la debida autorización a ciertos productos (como interferón preparado a partir de células linfoides, anticuerpos monoclonales y vacunas antirrábica y antipoliomielítica inactivadas). Además, el Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos aprobó en 1981 el uso de linajes celulares continuos no tumorigenos y exentos de virus para la producción de la vacuna antipoliomielítica inactivada. De hecho, desde 1978 la tendencia general ha sido aceptar los linajes celulares continuos para la producción de varias sustancias biológicas. Sin embargo, cuando se reunió un grupo de consultores para considerar la preparación de pautas de la OMS para la vacuna antihepatitis B, producida por técnicas de DNA recombinante en líneas celulares continuas, se señaló la conveniencia de que la OMS reuniera a un grupo de expertos para considerar los asuntos relacionados con el empleo de células eucarióticas y procarióticas para la elaboración de productos biológicos, prestando particular atención a los posibles riesgos del DNA contaminante, con el fin de ofrecer orientación en el ámbito internacional sobre la aceptabilidad de varios substratos celulares y estrategias de producción. Por tanto, el Director General reunió a un Grupo de Expertos en Sustancias Biológicas para que asesorara a la OMS en estos asuntos.

Los documentos básicos que contenían información experimental y teórica se sometieron a debate y llevaron a formular las conclusiones que se incluyen en una sección posterior de este informe (sección 3). Un motivo de profunda preocupación era el riesgo de malignidad a largo plazo que representaba el DNA contaminante heterogéneo, especialmente si contenía secuencias codificadoras o regu-

ladoras posiblemente oncogénicas. Esta fue una verdadera preocupación porque muchas personas sanas, inclusive lactantes, podrían ser vacunadas con productos derivados de linajes celulares continuos o recibirlos en otra forma.

Se ha comprobado la inocuidad de ciertos linajes celulares continuos como substratos para la producción de sustancias biológicas. Por ejemplo, se ha preparado una vacuna contra la fiebre aftosa a partir de virus inactivados en la línea celular BHK-21 y se estima que en los próximos veinte años se administrarán más de 100 millones de dosis al ganado. En la inspección de la canal de las reses sacrificadas no se han observado efectos nocivos atribuibles a la vacuna, lo que indica que, a corto plazo (de dos a cuatro años), esta vacuna ha sido inocua. Aunque la experiencia clínica con sustancias biológicas producidas para uso humano en linajes celulares continuos ha sido más reciente y más limitada que la experiencia con productos veterinarios, se observó que en un período de tres años a partir de 1983, ya se habían administrado a la población infantil unos 19 millones de dosis de vacuna antipoliomielítica inactivada producida en células Vero.

## 2. ASUNTOS CONSIDERADOS POR EL GRUPO DE ESTUDIO

El Grupo de Estudio trató asuntos de dos clases: primero, la aceptabilidad de elaborar un producto biológico en un nuevo sistema celular cuando ya se fabrica el mismo producto genérico con un método aprobado (véase el inciso *a infra*), y segundo, el riesgo relacionado con ciertas clases de posibles contaminantes del producto, inclusive DNA contaminante heterogéneo (véanse los incisos *b-f infra*), virus (véase *g infra*) y proteínas transformadoras (véase el inciso *h infra*).

Las preguntas específicas discutidas por el Grupo de Estudio fueron las siguientes:

a) ¿Qué postura se debe adoptar respecto de la aceptabilidad de un producto elaborado en una línea celular continua cuando existen otros métodos de producción en otro sistema celular? Por ejemplo, el interferón alfa se puede producir en *Escherichia coli*, así como en células linfoides humanas y la vacuna contra la hepatitis B se puede elaborar a partir de plasma humano y en levadura, así como en líneas celulares continuas.

b) ¿Existe una cantidad absoluta de DNA por dosis de producto (o dosis acumulada en el caso de sustancias biológicas administradas a repetición) por debajo de la cual la probabilidad de un efecto biológico es tan poca que es realmente nula? ¿Mejoraría el tratamiento con nucleasa la confianza en la inocuidad del producto o sencillamente sería otro motivo de preocupación, quizá mucho mayor que la que causa el DNA?

c) ¿Qué tipo de DNA debe ser el centro de atención en las pruebas para cuantificar el DNA en un producto o en una etapa dada del proceso de elaboración? Si se emplean secuencias reguladoras para construir la célula recombinante ¿se debería tratar específicamente de buscar esas secuencias?, ¿son adecuadas como sonda genérica las secuencias muy repetitivas y dispersas, como *Alu* en el DNA humano?

d) ¿Son las secuencias víricas, si es que existen en un determinado linaje celular, motivo de particular preocupación o se pueden considerar en sentido genérico con el resto del DNA celular?

e) ¿Cuáles son los modelos experimentales preferidos para determinar el potencial de transformación del DNA de las células consideradas para empleo y cuánto deben durar esos estudios?

f) ¿Qué tan valiosos son los estudios de comprobación de la capacidad que existe en el proceso de elaboración para eliminar o inactivar los virus indeseables y el DNA en comparación con los estudios del producto acabado?

g) ¿Son adecuados los procedimientos de detección de los virus importantes incluidos en los requisitos de la OMS para la caracterización de líneas celulares continuas?

h) ¿Se deben caracterizar los linajes celulares continuos según la capacidad que tengan de producir proteínas transformadoras? ¿Cuáles son los sistemas preferidos de valoración? Si se encuentran proteínas transformadoras ¿qué tanto es el riesgo para el receptor del producto y qué concentraciones serían aceptables?

i) ¿Qué criterios de pureza conviene aplicar al producto acabado para poder garantizar la aceptabilidad en forma razonable?

### 3. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Varias características convierten las líneas celulares continuas en sustratos particularmente apropiados para la producción de una

amplia gama de sustancias biológicas para uso humano, entre las que se destacan las siguientes:

- bajo costo (en relación con otros sustratos de mamíferos tales como células primarias, que se deben someter a pruebas intensivas en cada cosecha);
- posibilidad de evitar el empleo de primates como fuente de células primarias para producción;
- capacidad de preparar, normalizar y almacenar semillas celulares;
- facilidad de preparar cultivos en suspensión en gran escala;
- susceptibilidad a la infección por diversos virus de importancia para el hombre;
- relativa facilidad de integración con los plasmidios de DNA recombinante y clonación subsiguiente de sustancias transformadoras de alto rendimiento;
- buenas posibilidades de elaboración correcta de proteínas de mamíferos codificadas por el DNA transferido, lo que mejora la probabilidad de que el producto tenga una conformación correcta;
- secreción (con o sin manipulación genética) de productos al medio.

Estas propiedades no sólo son importantes para la producción de sustancias biológicas en los países desarrollados, sino que pueden facilitar mucho la transferencia de la capacidad de producción de vacunas a los países en desarrollo, lo que constituye una importante meta de la OMS.

Sin embargo, el uso de sustancias biológicas producidas en líneas celulares continuas puede exponer al hombre a varios riesgos. Antes de proceder a su explicación y análisis, el Grupo de Estudio examinó algunos asuntos generales relacionados con la aceptación de nuevas sustancias biológicas.

### **3.1 Evaluación del riesgo en las actividades de investigación y desarrollo**

Existen varios escalones importantes en la evolución de un criterio nuevo de la teoría a la práctica. El primero es la evaluación de los riesgos que tiene o podría presentar para el ser humano un nuevo medicamento, una vacuna o un sustrato celular. En la mayoría

de los países, si no en todos, se exigen datos de inocuidad antes de administrar un nuevo medicamento o producto biológico a sujetos humanos en el medio clínico. En realidad, se han establecido normas éticas nacionales e internacionales para proteger al ser humano contra riesgos desmedidos durante las fases de experimentación con nuevos productos terapéuticos y profilácticos. Antes de aprobar los productos preparados a partir de líneas celulares continuas para uso en seres humanos, varios comités analizaron los riesgos y beneficios que implican teniendo en cuenta no sólo los datos en pro de la inocuidad del producto, sino también sus beneficios relativos en comparación con los de los ya existentes. Antes de seguir adelante con los estudios clínicos efectuados en sujetos humanos, esos comités evaluaron la inocuidad de cada producto según los datos a su disposición, considerando la capacidad que existe en varias etapas del proceso de elaboración de retirar e inactivar sustancias contaminantes posiblemente nocivas. Algunas autoridades nacionales de control decidieron que convenía proseguir los estudios experimentales en sujetos humanos. Los comités de estudio clínico y, en algunos casos, las autoridades nacionales de control, llegaron a la conclusión de que era razonable seguir estudiando en el ser humano varios productos preparados con líneas celulares continuas. No esperaban que el empleo de dichos linajes tuviera ningún riesgo palpable para el hombre. Sería contrario a los conceptos básicos de la medicina exponer a sabiendas al riesgo de cáncer a pacientes con enfermedades graves o a personas sanas, particularmente cuando existen sustitutos de muchos de los productos que hoy en día se fabrican de líneas celulares continuas u otros que pronto recibirán aprobación. La opinión general de los grupos que han considerado estos asuntos hasta ahora es que, cualesquiera que hayan sido los riesgos potenciales, los datos sobre la inocuidad de los productos justifican su aceptación. Sin embargo, es prudente mantenerse alerta en cuanto a los riesgos imprevistos y considerar la posibilidad de efectuar los debidos estudios de seguimiento a largo plazo de grupos de receptores de esos nuevos productos, a medida que se generalice su uso. Teniendo esto en cuenta, el Grupo de Estudio llegó a la conclusión de que la decisión básica sobre la inocuidad de un producto elaborado a partir de líneas celulares continuas se debe adoptar en el momento de aprobar el primer ensayo clínico. Ese criterio inicial debe modificarse sólo si se presentan ulteriormente datos nuevos y pertinentes.

### **3.2 Productos fabricados con otros métodos**

El Grupo de Estudio también consideró la aceptabilidad del empleo de líneas celulares continuas para la elaboración de productos como el interferón alfa, la vacuna antipoliomielítica y la vacuna antihepatitis B, que se pueden producir por otros métodos. Tanto los individuos como la sociedad tienen que elegir continuamente cuando se trata de la inocuidad relativa y los beneficios de los productos. La selección de grados de inocuidad aceptable entre varias posibilidades ha tenido un papel importante en la historia de la preparación de productos biológicos y ha incluido la consideración de asuntos como cuáles deben ser las cepas víricas o los substratos celulares que se han de usar para la producción de vacunas.

El Grupo de Estudio concluyó que, cuando existen datos fiables sobre la inocuidad de un producto preparado de líneas celulares continuas, aquél deberá considerarse aceptable. La existencia de un proceso de elaboración aprobado del mismo producto en otro sistema celular no se considera pertinente para aceptar o rechazar un producto derivado de una línea celular continua. Cada producto debe valer por sus propios méritos en lo que respecta a inocuidad y eficacia.

### **3.3 Posibles riesgos de las sustancias biológicas producidas en líneas celulares continuas**

Los principales riesgos que puede tener el uso de sustancias biológicas producidas en líneas celulares continuas se dividen en tres clases: DNA contaminante heterogéneo, virus y proteínas transformadoras. A continuación se resume la evaluación del riesgo de cada uno. En los anexos 1 y 2, respectivamente, se han incluido explicaciones más amplias sobre el DNA contaminante heterogéneo y las proteínas transformadoras.

#### *3.3.1 DNA contaminante heterogéneo*

El Grupo de Estudio concluyó que, basándose en los datos experimentales a su disposición, el riesgo relacionado con el DNA contaminante heterogéneo en un producto derivado de líneas celulares

continuas es insignificante cuando la cantidad de DNA es de 100 pg o menos en una dosis única administrada por vía parenteral. En la evaluación de la inocuidad de cualquier producto en lo que respecta al DNA se debe tener en cuenta: *a)* la eliminación de la actividad biológica del DNA en diversas etapas del proceso de elaboración y *b)* la reducción de la cantidad de DNA durante la purificación del producto en dicho proceso. Se puede considerar que un producto determinado es inocuo a partir de datos fiables sobre cualquiera de estas dos operaciones, o ambas. Puesto que hay muy pocas probabilidades de que se produzca un efecto biológico con 100 pg de DNA contaminante heterogéneo por dosis del producto administrada por vía parenteral, el tratamiento de productos con nucleasa durante la elaboración quizá crea más preocupaciones que las que resuelve.

El empleo de secuencias especiales de DNA, como secuencias reguladoras víricas, en la construcción de células recombinantes se considera aceptable porque no se ha comprobado que dichas secuencias representen ningún otro riesgo distinto del que acarrea el DNA celular contaminante heterogéneo en general. Sin embargo, se debe confirmar el proceso de elaboración para demostrar que esas secuencias no se concentren durante la cosecha o en otras etapas importantes. Es de esperar que los productos de DNA recombinante se sometan a estricta purificación y que la cantidad de DNA por dosis sea menos de 100 pg; en algunos casos, puede llegar a ser indetectable.

Cuando existen posibilidades de que un producto se contamine con DNA con importante actividad biológica, deberá tratarse de detectar el DNA mediante técnicas apropiadas, algunas de las cuales se explican en el anexo 1. Se está tratando de introducir técnicas más modernas de detección del DNA.

Por muchos años se ha recurrido a la técnica de agentes víricos inactivantes para la preparación de vacunas inocuas y eficaces contra la poliomielitis, la rabia y la hepatitis B. Algunos datos indican que dichos agentes pueden destruir también la actividad biológica del DNA, con lo que aumenta la confianza en la inocuidad de esas preparaciones aun cuando la cantidad de DNA en una dosis parenteral del producto sea superior a 100 pg. Sin embargo, el Grupo de Estudio concluyó que se necesitaban datos más específicos sobre los efectos de estos agentes inactivantes en las condiciones del proceso de elaboración con el fin de derivar conclusiones firmes sobre su potencial para inactivar el DNA.

### 3.3.2 Virus

El Grupo de Estudio analizó el riesgo que pueden tener para el receptor humano los productos fabricados en células que contengan agentes víricos. Estos agentes pueden ser virus completos con patrones conocidos de duplicación como el virus 40 de los simios (SV 40), partículas víricas como los retrovirus del tipo A que se pueden observar en el microscopio electrónico y genomas víricos persistentes o partes de éstos, por ejemplo, los de los virus de la hepatitis B y de Epstein-Barr. Las células se pueden dividir en tres clases, según su potencial como portadoras de agentes víricos patógenos para el ser humano:

- Alto riesgo: Células de la sangre y de la médula ósea de primates humanos y no humanos y células de caprinos y ovinos; hibridomas cuando por lo menos uno de los miembros de fusión proviene de primates humanos o no humanos.
- Mediano riesgo: Células no hematógenas de mamíferos, como fibroblastos y células epiteliales.
- Poco riesgo: Células diploides humanas y células de tejido aviar.

Al hacer estas distinciones en cuanto al riesgo, cabe tener en cuenta los siguientes puntos:

a) Los linfocitos humanos y los macrófagos pueden ser portadores de virus latentes, como los retrovirus humanos, que se pueden activar cuando las células quedan expuestas a factores estimulantes del crecimiento durante cultivo *in vitro*. La existencia de retrovirus infecciosos para las células humanas coloca a las células hematógenas de primates no humanos en el grupo de alto riesgo. Si se emplean leucocitos humanos primarios para la producción de interferón o de otras sustancias biológicas, debe demostrarse que en el proceso de elaboración se inactivan los retrovirus humanos conocidos. Además, será importante examinar los productos fabricados en células no hematógenas de primates para determinar si contienen virus patógenos para el hombre y que pueden ser alojados por las especies de las que se tomaron las células en un principio. Se ha demostrado que las células de caprinos y ovinos se contaminan a me-

nudo con lentivirus y con «virus lentos» relacionados con las encefalopatías espongiiformes subagudas.

b) En los últimos veinte años se han empleado células renales primarias de monos para producir millones de dosis de la vacuna antipoliomielítica y aunque se descubrieron virus latentes como el virus 40 de los simios en esas células, se introdujeron medidas de control para eliminar cualquier riesgo relacionado con la fabricación de vacunas en células que contenían esos virus endógenos. Quizá se necesiten otros testigos a medida que se descubren nuevos agentes víricos.

c) Las líneas continuas de células no hematógenas de primates humanos y no humanos pueden contener virus o tener genes víricos integrados a su DNA. En todo caso, la expresión del virus puede ocurrir en las condiciones existentes en los cultivos *in vitro*.

d) Se sabe que los tejidos y las células de los roedores y las aves alojan virus, pero no se ha comprobado que los productos provenientes de esas fuentes transmitan enfermedades al ser humano. Por ejemplo, por muchos años se han producido grandes cantidades de vacunas contra la fiebre amarilla y el sarampión y de vacunas de virus vivos contra influenza en huevos que contienen virus de leucosis aviar, pero no se ha comprobado que esos productos hayan tenido efectos nocivos en su larga historia de empleo para la inmunización humana. Por otra parte, los virus de la coriomeningitis linfocítica y de la fiebre hemorrágica que alojan los roedores han causado enfermedades en el hombre por infección directa.

e) Por más de diez años se han empleado fibroblastos diploides humanos para la producción de vacunas y, aunque en un principio se expresó preocupación por la posibilidad de que las células contuvieran un virus humano latente, no se ha encontrado todavía este agente y las vacunas producidas de esta clase de células han sido inocuas.

Teniendo en cuenta esta clasificación de las células según su potencial para transmitir virus patógenos para el ser humano, el Grupo de Estudio reconoció que los productos fabricados de los diversos tipos de células citados causan diferentes grados de preocupación y, por tanto, deben someterse a pruebas distintas. Sin embargo, se subrayó que cuando se emplean líneas celulares diploides o continuas para la producción, hay que usar un sistema de lotes de semillas celulares y que la célula debe clasificarse según se indica en los requisitos fijados por la OMS. La identificación de virus, viroides y es-

estructuras similares debe constituir una parte importante de la caracterización de esos bancos celulares. Por ejemplo, se habrá de prestar mucha atención a la posible presencia de RNA contaminante similar a un viroide, como el agente Delta, y emplear métodos apropiados para detectarlo.

Cuando se examinan líneas celulares de roedores o de aves para determinar la presencia de virus, deberán acentuarse mucho en la evaluación del riesgo los resultados de los estudios en que se trata de efectuar la transmisión a células o animales seleccionados como objetivo. El riesgo para el ser humano no se debe determinar *únicamente* basándose en pruebas ultraestructurales de la presencia de agentes víricos en las células.

Puede haber ciertos agentes microbianos todavía no descubiertos, para cuya detección no existen pruebas ni medios. Sin embargo, durante la larga historia de empleo de animales, tejidos y células para fabricación de productos para administración al ser humano, los raros casos de contaminación vírica descubiertos se han debido a la activación de virus latentes conocidos, ya sea en el material empleado para fabricación o en el producto propiamente dicho, y no a «nuevos» agentes que transmiten la enfermedad al ser humano.

El Grupo de Estudio subrayó la importancia de confirmar la capacidad que existe en un proceso de elaboración para eliminar e inactivar los virus que pueden representar un riesgo para el ser humano cuando se propone el uso de células o de líneas celulares portadoras de esos virus para la fabricación de sustancias biológicas para administración al hombre. Como sucede con el DNA contaminante heterogéneo, debe establecerse un amplio margen de seguridad en cualquier proceso de inactivación o purificación. Además, las células del ser humano o de animales con enfermedades de origen desconocido y las células de animales que puedan contener «virus lentos» no se deberán emplear para producir sustancias biológicas para administración al hombre.

### 3.3.3 *Proteínas transformadoras*

El riesgo aparente de las proteínas codificadas con oncógenos se limita a los factores de crecimiento, ya que esas son las únicas proteínas que pueden ejercer efectos biológicos por medio de la superficie celular. Las células empleadas para producir sustancias biológicas pueden secretar factores del crecimiento, pero los riesgos de esos

factores son limitados, ya que sus efectos de activación del crecimiento son de ordinario transitorios y reversibles, no se duplican y muchos se inactivan rápidamente *in vivo*.

Por lo común, los factores del crecimiento no parecen ser oncógenos. Dada la cantidad de factores del crecimiento conocidos que segregan las células de cultivo, sería necesario recogerlos del medio de cultivo antes de que puedan tener actividad biológica *in vivo*. Sin embargo, en circunstancias excepcionales los factores del crecimiento pueden contribuir a la oncogénesis, pero aun en esos casos, los tumores al parecer siguen dependiendo de la continua administración del factor respectivo.

En resumen, el Grupo de Estudio no consideró que la presencia de factores del crecimiento conocidos de acción contaminante en las concentraciones en que se encuentran de ordinario constituyan un grave riesgo para la preparación de productos biológicos a partir de líneas celulares continuas.

### 3.4 Conclusiones generales

Aunque es posible estimar un límite máximo de contaminación de un producto acabado con DNA heterogéneo y todos los experimentos notificados indican que las cantidades de DNA expresadas en picogramos son biológicamente inactivas en varias pruebas, no se puede afirmar que en los productos derivados de líneas celulares continuas haya *completa* ausencia de DNA o del riesgo que implica, así como tampoco se puede afirmar eso respecto de los productos derivados de cultivos de células primarias y diploides. Sin embargo, se considera que hay muy pocas probabilidades de que el DNA de líneas celulares continuas o de otros sistemas celulares produzca malignidad y otras enfermedades. Además, existen métodos comprobados y eficaces para preparar productos inocuos. Por ejemplo, con métodos apropiados de purificación e inactivación se ha podido preparar una vacuna antihepatitis B inocua de sangre de pacientes infectados, aunque esa fuente de material implica riesgos muy grandes. Muchas autoridades nacionales de control han aprobado esas vacunas antihepatitis B porque algunos datos fiables muestran que el proceso de elaboración ha resultado en productos inocuos y eficaces que se ajustan a los requisitos de la OMS.

Se subrayó la importancia de comprobar la eficacia con que se

inactiva y/o elimina material indeseable como DNA celular y virus en diversas etapas del proceso de elaboración. La comprobación de la capacidad que existe en el proceso para elaborar un producto con ciertas especificaciones y la determinación de la seguridad de dicho proceso son esenciales para sentar la base de una sustancia biológica aceptable derivada de líneas celulares continuas. Una vez que se ha comprobado el proceso y determinado la seguridad de la producción, bastarán pruebas limitadas apropiadas para cada producto, como se ha venido haciendo con las sustancias biológicas en épocas pasadas. Se observó que éste es el método propuesto en los requisitos de la OMS para la vacuna antihepatitis B producida con técnicas de DNA recombinante.

El Grupo de Estudio concluyó que, en general, las líneas celulares continuas son aceptables como sustratos para la producción de sustancias biológicas, pero que es preciso tener en cuenta las diferencias en la naturaleza de esos productos y en las características de los procesos de elaboración al adoptar decisiones sobre la aceptabilidad de un producto determinado. Por tanto, no hay razón para dejar de considerar los linajes celulares continuos como sustratos para productos biológicos. En ese sentido, el Grupo de Estudio concordó con las medidas tomadas hasta la fecha por los comités, mediante las cuales se aprueba el uso de varios productos derivados de líneas celulares continuas sólo después de comprobar que el producto proveniente del proceso de elaboración respectivo no presente ningún riesgo detectable que pueda atribuirse al sustrato celular.

Además de las que ya existen en el mercado, se producirán muchas otras sustancias biológicas a partir de líneas celulares continuas. Estas se pueden agrupar, en términos generales, en tres clases: vacunas, proteínas biológicamente activas y anticuerpos monoclonales. La dosis y la frecuencia de administración de esos productos puede variar mucho en los tres grupos principales, así como dentro de un grupo. Eso subraya la importancia de tener en cuenta los detalles específicos de un producto, como la dosis y la vía y la frecuencia de administración, al tratar de determinar la capacidad que existe en el proceso de elaboración para ofrecer un producto inocuo.

Se consideró que los riesgos del DNA contaminante heterogéneo eran insignificantes en las preparaciones administradas por vía oral. El principal requisito fijado para esos productos es la eliminación de virus contaminantes y de proteínas tóxicas. Si se siguen los principios de fabricación establecidos por el Grupo de Estudio para los pro-

ductos que se administran por vía parenteral, se reducirá mucho el riesgo proveniente de la administración oral de los mismos.

#### **4. RECOMENDACIONES**

1. La OMS debe fomentar el establecimiento de varios bancos de semillas de líneas celulares continuas para ayudar a los Estados Miembros y a los fabricantes, cuando así lo soliciten, a establecer bancos celulares de trabajo que se ajusten a los requisitos fijados por la OMS para la caracterización de líneas celulares continuas destinados a la producción de sustancias biológicas.

2. La OMS debe tomar todas las medidas posibles para fomentar la sustitución de sustancias biológicas derivadas de tejidos neurales con otras derivadas directamente de cultivos celulares, incluidos las líneas celulares continuas o preparadas mediante técnicas de DNA recombinante.

3. La OMS debe fomentar y coordinar estudios para determinar el efecto de varios agentes inactivantes, como la propiolactona y la formalina, en la actividad biológica del DNA.

4. Las autoridades nacionales de control deben considerar el establecimiento de grupos multidisciplinarios para que las asesoren en lo relativo a la inocuidad y la aceptabilidad de las sustancias producidas con técnicas biológicas modernas, ya que los asuntos respectivos son a menudo nuevos y complejos y exigen el juicio colectivo de expertos de distintas disciplinas.

5. El Grupo de Estudio reconoce que los asuntos considerados en este informe, especialmente la transformación maligna de las células humanas, son campos de investigación que avanzan a paso acelerado. Por tanto, recomienda que la Secretaría de la OMS observe detenidamente los futuros acontecimientos en este campo y le solicite al Director General que reúna a grupos de científicos cuando lo estime conveniente.

#### **5. NOTA DE AGRADECIMIENTO**

El Grupo de Estudio desea expresar sus agradecimientos por el valioso aporte que hicieron a su trabajo los siguientes funcionarios de la Organización Mundial de la Salud y del Organismo Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer: Dr. F. Assaad, Director, División de Enfermedades Transmisibles, OMS, Ginebra, Suiza; Dr. J. Dunne, Jefe, Sección de Preparaciones Farmacéuticas, OMS, Ginebra, Suiza; Dr. J. Es-

parza, Servicios de Apoyo en Microbiología e Inmunología, OMS, Ginebra, Suiza; Dr. Y. Ghendon, Servicios de Apoyo en Microbiología e Inmunología, OMS, Ginebra, Suiza; Dr. V. Grachev, Sección de Sustancias Biológicas, OMS, Ginebra, Suiza; Dr. R. Montesano, Organismo Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, Lyon, Francia; Dr. Y. Pervikov, Servicios de Apoyo en Microbiología e Inmunología, OMS, Ginebra, Suiza, y Dr. P. Sizaret, Sección de Sustancias Biológicas, OMS, Ginebra, Suiza.

## DNA CONTAMINANTE HETEROGENEO

El principal riesgo que implica el DNA contaminante heterogéneo en preparaciones biológicas para uso humano se refiere a su posible actividad patógena. Después de considerar los datos disponibles y los cálculos del potencial tumorigeno de las concentraciones residuales de DNA, el Grupo de Estudio concluyó que el riesgo que presenta el DNA contaminante heterogéneo es insignificante en concentraciones de 100 pg o menos en dosis aplicables por vía parenteral. Ese valor se basa en los resultados experimentales obtenidos en ensayos en los que se determinó la actividad patógena de las secuencias de DNA en animales susceptibles. Se examinaron las siguientes secuencias de DNA:

- DNA de virus oncógenos, inclusive virus polioma, virus 40 de los simios, adenovirus y virus del sarcoma de Rous;
- DNA genómico clonado de virus de la hepatitis B;
- DNA cromosómico de células tumorales y de genes *c-ras* mutantes clonados.

### **DNA de virus oncógenos, inclusive virus polioma, virus 40 de los simios, adenovirus y virus del sarcoma de Rous**

El DNA vírico inyectado a animales de experimentación es levemente oncógeno (cuadro 1). Los resultados se pueden resumir de la manera siguiente:

#### *Virus polioma*

La inyección de 0,5 a 2 µg de DNA de virus polioma en hámsteres o ratas recién nacidos produjo tumores en 10 %-80 % de los animales (1-3).

#### *Virus 40 de los simios*

La inyección subcutánea de 1 ó 2 µg de DNA de virus 40 de los simios a hámsteres recién nacidos ocasionó sarcomas en 33 %-55 % de los animales (2, 4).

#### *Adenovirus*

Se informó que dosis de 3 a 5 µg de DNA de adenovirus de los simios causaron tumores en hámsteres recién nacidos y de 21 días

Cuadro 1. Oncogenicidad del DNA de los virus de tumores en animales

Fuente	DNA		Animales sometidos a ensayo	Vía de inyección	Inducción de tumores <sup>a</sup>	Referencia
	Cantidad (µg)					
Virus polioemia	0,5		Hámster recién nacido	i.p.	10 % (5/52)	1
	1		Hámster recién nacido	s.c.	11 % (2/22)	3
	2		Rata recién nacida	s.c.	60 % (33/55)	2
	0,2		Rata recién nacida	s.c.	22 % (2/9)	2
	2 <sup>b</sup>		Hámster recién nacido	s.c.	80 % (4/5)	2
Virus 40 de los simios	1 ó 2		Hámster recién nacido	s.c.	33 % (11/33)	4
	2		Hámster recién nacido	s.c.	55 % (4/7)	2
	2 <sup>c</sup>		Hámster recién nacido	s.c.	53 % (9/17)	2
	1-10 (DNA subgenómico)		Hámster recién nacido	s.c.	0 % (0/131)	11
Adenovirus						
	Adenovirus de los simios 7	33	Hámster recién nacido	s.c.	28 % (7/25)	5
Adenovirus humanos 12		5	Hámster recién nacido	s.c.	30 % (24/82)	6
		2,5	Hámster recién nacido	s.c.	7 % (4/59)	6
		4	Hámster recién nacido	s.c.	4 % (2/50)	7
Virus del sarcoma de Rous (v-vrc)	22		Pollos	Membrana de las alas	65 % (11/17)	8

<sup>a</sup> Porcentaje de animales en que se presentaron tumores; las cifras reales se expresan entre paréntesis.

<sup>b</sup> Este plasmidio expresó solamente la proteína T intermedia del polioemia. Los períodos de latencia de la oncogénesis fueron de 5 a 10 veces mayores que los del DNA de polioemias de tipo salvaje. El gene T intermedio no produjo tumores en ratas recién nacidas.

<sup>c</sup> Una combinación de los genes del antígeno T del virus 40 de los simios y del antígeno T pequeño del polioemia.

(5, 6). La inyección en hámsteres recién nacidos de 4 µg de DNA de adenovirus 12 humano o una cantidad equivalente del fragmento de DNA transformador clonado resultó en oncogénesis en 2 de 50 animales (7).

#### *Virus del sarcoma de Rous*

Una inyección de 2 µg de un fragmento de DNA provírico subgenómico del virus del sarcoma de Rous que contenía el gene *src* vírico aplicada a pollos en la membrana de las alas causó tumores en un 65 por 100 de esos animales (8). Los tumores comenzaron a desaparecer al cabo de varias semanas.

Estos y otros resultados indican que el DNA de virus oncógenos puede inducir tumores en animales, pero, de ordinario, sólo cuando se inyecta en dosis que oscilan entre 1 y 10 µg.

#### **DNA genómico clonado del virus de la hepatitis B**

Una inyección intrahepática de 5 µg de DNA clonado del virus de la hepatitis B aplicada a chimpancés causó hepatitis B, pero una inyección intravenosa de ese DNA no tuvo ningún efecto (9).

#### **DNA cromosómico de células de tumores y de genes *c-ras* mutantes clonados**

Recientemente se han realizado en varios laboratorios experimentos con DNA cromosómico de células tumorales y con genes *ras* clonados; unos ya se han concluido y otros están todavía en marcha (cuadro 2). Hasta ahora todas las pruebas han sido negativas, tanto con el DNA cromosómico aislado de células T24 de carcinoma de la vejiga urinaria como con genes *H-ras* o *K-ras* activados clonados, al menos durante los períodos de observación. La cantidad de DNA inyectado osciló entre 10 y 50 µg de DNA cromosómico y entre 10 y 50 µg de genes *ras* activados clonados (3, 10).

#### **Cálculos relativos a la concentración de DNA y a su potencial oncógeno**

Los experimentos realizados han permitido demostrar que 2 µg de DNA del virus poliooma o del virus 40 de los simios pueden inducir tumores en cerca de 50 % de los animales sometidos a ensayo. Si se define 2 µg de DNA como la «dosis oncógena», la cantidad re-

Cuadro 2. Pruebas de la oncogenicidad del DNA celular que contiene un gene *ras* activado y de los genes *ras* activados clonados <sup>a</sup>

DNA		Cantidad (µg)	Animales sometidos a ensayo	Vía de inyección	Inducción de tumores <sup>b</sup>	Referencia
Tipo						
DNA genómico T24	10	(H- <i>ras</i> )	Rata recién nacida	s.c.	0% (0/20)	10
DNA genómico EJ-6 de rata <sup>c</sup>	500	(H- <i>ras</i> )	Hámster recién nacido	s.c.	0% (0/8)	3
Cromatina de células T24	~ 1000		Monos rhesus	Intramuscular, i.v., intracerebral (dosis única o múltiple)	En marcha	(Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU.)
Genes H- <i>ras</i> o K- <i>ras</i> activados clonados	2-10	(K- <i>ras</i> )	Rata recién nacida	s.c.	0% (0/10)	10
	2-10	(H- <i>ras</i> )	Rata recién nacida	s.c.	0% (0/14)	10
	50	(H- <i>ras</i> )	Hámster recién nacido	s.c.	0% (0/15)	3

<sup>a</sup> Los periodos de observación en estos pruebas no pasaron de dos años.

<sup>b</sup> Porcentaje de animales con oncogenesis, las cifras reales aparecen entre paréntesis.

<sup>c</sup> Las células EJ-6 de rata son una línea de células embriónicas transformadas por el oncogene H-*ras* del carcinoma EJ de la vejiga urinaria.

residual de 100 pg de DNA de virus de tumores en una preparación biológica correspondería a

$$\frac{100}{2 \times 10^6} = 0,5 \times 10^{-4} \text{ dosis oncogena.}$$

Sin embargo, el DNA contaminante consiste normalmente en DNA cromosómico y no en DNA vírico puro. Si el DNA cromosómico contiene un oncógeno activado y hay sólo una copia por genoma, el oncógeno representará sólo  $1/10^6$  del DNA total.<sup>1</sup> Luego 100 pg de DNA cromosómico contaminante heterogéneo contendría  $100 \times 10^{-6} = 10^{-4}$  pg de oncógeno activado, que corresponde a

$$\frac{10^{-4}}{2 \times 10^6} = 0,5 \times 10^{-10} \text{ dosis oncogena.}$$

El riesgo relacionado con esta cantidad de DNA es tan poco que se puede considerar insignificante.

Cabe tener en cuenta varios puntos al estimar el riesgo. Primero, todos los cálculos se basan en la suposición de que el factor de riesgo de oncogénesis disminuye en forma lineal al reducirse la concentración de DNA. Eso quizá no sea necesariamente correcto, ya que una cantidad de DNA que no tiene ningún efecto biológico mensurable en una prueba normal, porque su concentración es demasiado baja, puede tener efectos en ciertas condiciones o en ciertos órganos o tejidos. Segundo, no se ha determinado claramente si el riesgo relacionado con exposición consecutiva a DNA es acumulativo o no. Tercero, se debe considerar la posibilidad de que las preparaciones de DNA que no son oncógenas en sistemas experimentales provoquen cambios en el ser humano que aumentarían la incidencia de tumores después de prolongados periodos latentes. Cuarto, los experimentos realizados con animales cuyo ciclo biológico es corto no permiten determinar los efectos de las secuencias adquiridas de DNA a largo plazo.

#### **Cuantificación del DNA contaminante heterogéneo o de las secuencias oncógenas**

El DNA celular residual de los productos biológicos se cuantifica de ordinario mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Para esas pruebas se han utilizado las siguientes sondas:

<sup>1</sup> Si la cantidad de DNA genómico por célula tiene una masa de 10 pg y si un oncógeno mide 10 kilobases ( $= 10^{-5}$  pg), el oncógeno representará  $1/10^6$  del genoma.

a) Secuencias muy repetitivas específicas de cada especie que ocurren en un gran número de copias en el genoma celular, como las secuencias *Alu* en el DNA humano.

b) Secuencias específicas de los genes de interés que se sabe que contiene la célula, como las de un virus o un oncógeno.

Además, quizá convenga disponer de una técnica que permita detectar el DNA en general, independientemente de su secuencia.

### Referencias

1. ISRAËL, M. A. ET AL. Biological activity of polyoma viral DNA in mice and hamsters. *Journal of virology*, **29**: 990-996 (1979).
2. BOUCHARD, L. ET AL. Tumorigenic activity of polyoma virus and SV40 virus DNAs in newborn rodents. *Virology*, **135**: 53-64 (1984).
3. MUFSON, R. A. Y GESNER, T. Lack of tumorigenicity of cellular DNA and oncogene DNA in newborn hamsters. *In vitro monograph*, **6**: 168 (1985).
4. SOL, C. J. A. Y VAN DER NOORDAA, J. Oncogenicity of SV40 DNA in the Syrian hamster. *Journal of general virology*, **37**: 635-638 (1977).
5. BURNETT, J. P. Y HARRINGTON, J. A. Simian and adenovirus SA<sub>7</sub> DNA: chemical physical and biological studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **60**: 1023-1029 (1968).
6. BURNETT, J. P. ET AL. Retention of tumour-inducing capacity by adenovirus DNA after cleavage by restriction endonucleases. *Nature* (Londres), **254**: 158-159 (1975).
7. JOCHEMSEN, H. *Studies on the transforming genes and their products of human adenovirus types 12 and 5*, Universidad de Leiden, 1979 (Tesis de doctorado).
8. FUNG Y-K. T. ET AL. Tumor induction by direct infection of cloned v-src DNA into chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**: 353-357 (1983).
9. WILL, H. ET AL. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* (Londres), **299**: 740-742 (1980).
10. LEVINSON, A. D. ET AL. Tumorigenic potencial of DNA derived from mammalian cell lines. *In vitro monograph*, **6**: 161-165 (1985).
11. MOYER, M. P. Y MOYER, R. C. The effect of oncogenes inoculated into hamsters. *In vitro monograph*, **6**: 140-147 (1985).

## PROTEINAS TRANSFORMADORAS

Las proteínas codificadas por genes celulares transformadores (*c-onc*) o por sus versiones mutantes pueden inducir la proliferación de muchos tipos celulares diferentes. Algunas proteínas *onc* ejercen efectos biológicos desde la parte externa de la célula, pero la mayoría tienen únicamente acción intracelular. Los genes *onc* se detectaron por primera vez como genes transformadores de los retrovirus transformadores agudos (1, 2). Durante la evolución natural se han conservado muy bien las secuencias de los homólogos celulares (*pro-onc*) de los oncógenos retrovíricos y son similares en los invertebrados y en el ser humano. Muchos homólogos *proto-onc* parecen tener muy poco potencial oncogénico o casi ninguno. Sin embargo, cuando se introducen a un vector retrovírico, al menos algunos de los homólogos *proto-onc* regulados en forma indebida o de los genes portadores de mutaciones estructurales tienen un potencial oncogénico similar al de los oncógenos víricos.

Las profundas alteraciones que pueden inducir esos genes en el crecimiento celular han llevado a preguntarse cuál sería el riesgo de la contaminación con oncógenos o de sus productos proteínicos para la formación de tumores cuando se administran materiales derivados de células al ser humano. Por consiguiente ¿cuáles son los peligros teóricos o reales que podrían surgir de las proteínas codificadas por oncógenos? Ya se han discutido los posibles problemas que surgen de la contaminación con homólogos *proto-onc* normales o mutantes (3). En esta discusión, el término «oncógenos» abarca cualquier gene cuyo producto codificado pueda estimular directamente la proliferación celular. Bajo esta amplia definición se podrán discutir ciertos factores del crecimiento que se excluirían al usar una definición más estricta (4, 5).

### Riesgos teóricos del DNA frente a la proteína

Además de las diferencias químicas obvias que existen entre los ácidos nucleicos y las proteínas, cabe hacer al menos dos distinciones cualitativas importantes entre los genes y sus productos que son directamente pertinentes por su potencial oncogénico. Se cree que la transformación maligna representa un cambio más o menos irreversible del estado proliferativo de la célula. En teoría, la administra-

ción inadvertida de un DNA oncógeno podría causar cambios que representan este proceso si el gene hubiera sido absorbido por la célula, ya que la adquisición estable de DNA podría llevar a la expresión constitutiva de su proteína *onc* codificada. Por consiguiente, la introducción del gene transformador puede causar un cambio genotípico irreversible en la célula, que resulta en continua exposición de ésta a la proteína *onc* en un sitio biológicamente pertinente, ya sea extracelular o intracelular. En cambio, en teoría, la administración inadvertida de proteína es menos peligrosa porque, a diferencia del DNA, aquella no tiene la capacidad de autorrenovarse. Por tanto, es posible que sus efectos queden estrictamente limitados por la cantidad administrada y que duren sólo mientras la proteína se mantiene biológicamente activa.

Una segunda diferencia importante es que las proteínas *onc* administradas pueden ser activas sólo si ejercen sus efectos biológicos por medio de la superficie de la célula, ya que la absorción celular de proteínas *onc* administradas con técnicas normales es tan ineficiente que ni siquiera en teoría podrían lograrse concentraciones intracelulares suficientes para ser biológicamente activas (6). Esto significa que la mayoría de las proteínas *onc* no serían potencialmente oncógenas como contaminantes, ya que casi todas son activas en forma de proteínas intracelulares (por oposición a las extracelulares). Por ende, deberán estudiarse con mayores detalles sólo las proteínas *onc* que tienen actividad extracelular. Sin embargo, los principios generales que se indican a continuación seguirán siendo pertinentes para considerar los posibles peligros de las proteínas *onc* de actividad intracelular si se administran en condiciones que favorecen su absorción celular en forma biológicamente activa, por ejemplo, dentro de vesículas unidas por lípidos.

#### **Factores del crecimiento**

Las proteínas *onc* que pueden inducir proliferación desde la parte externa de las células son factores del crecimiento que reciben de ordinario el nombre genérico de péptidos (7). El factor de crecimiento derivado de plaquetas es el prototipo de este grupo de moléculas que pueden dar una señal extracelular estimulante del crecimiento (8, 9). Este grupo también comprende el factor del crecimiento epidérmico, el factor del crecimiento transformador alfa, que está íntimamente relacionado con el anterior, el factor del crecimiento transformador beta, el factor del crecimiento obtenido en fibroblastos, la insulina, las somatomedinas (factores del crecimiento similares a la

insulina), la transferrina y el péptido liberador de gastrina (parecido a la bombesina). Los factores del crecimiento también pueden incluir moléculas que en un principio no se creía que tuvieran propiedades de estímulo del crecimiento, como el factor de la necrosis de tumores (10). Los factores del crecimiento se pueden examinar en forma cuantitativa, ya sea biológicamente empleando células susceptibles o por medio de radioinmunovaloraciones específicas.

El virus del sarcoma de los simios es el único retrovirus transformador cuyo oncógeno, *v-sis*, codifica un factor del crecimiento; *v-sis* proviene de uno de los dos genes del factor del crecimiento derivado de plaquetas. En contraste con los productos de la proteína de actividad intracelular de varios genes transformadores celulares, no se ha encontrado ninguna forma activada del factor del crecimiento derivado de plaquetas ni de otros factores del crecimiento con mayores propiedades de estímulo de éste (en comparación con la forma normal). En particular, el oncógeno *v-sis* no tiene una mayor actividad transformadora que su homólogo proto-*onc*. En ciertas circunstancias fisiológicas (como en la curación de heridas o en la formación de coágulos siguiente a esta) es posible que haya elevadas concentraciones de factores del crecimiento como los derivados de plaquetas para inducir localmente proliferación celular a consecuencia de una lesión. Es importante notar que los efectos de los factores del crecimiento son reversibles y que no se ha comprobado que esos factores sean específicamente mutagénicos. La administración inadvertida de factores del crecimiento como contaminantes representaría exposición a productos expresados en las células normales en ciertas condiciones fisiológicas. Pueden formarse tumores sólo si se administran en repetidas ocasiones dosis «farmacológicas» (es decir, no fisiológicas) y se supone que al dejar de administrar el factor de crecimiento cesa la formación de esos tumores.

Cada factor del crecimiento transmite su señal respectiva por medio de los receptores específicos localizados en la superficie de la célula. Por tanto, un factor del crecimiento sólo puede obrar sobre las células que demuestren tener el receptor apropiado. Los receptores de muchos factores del crecimiento se encuentran sólo en un subconjunto de células, aunque los del factor del crecimiento transformador beta están ampliamente distribuidos; esta distribución en muchos tipos distintos de células pueden guardar relación con la multiplicidad de funciones aparentes de dicho factor, que se dice que estimula la proliferación celular en ciertas circunstancias y la inhibe en otras.

Como se indicó anteriormente, los factores del crecimiento son sintetizados fisiológicamente por las células normales. Su síntesis puede ser elevada en varios estados patológicos y muchas células oncógenas sintetizan grandes cantidades de diversos factores (11). Se ha demostrado que la expresión de ciertos oncógenos cuyas proteínas tienen actividad intracelular estimula la secreción de factores del crecimiento. La secreción desmesuradamente elevada de esos factores por las células tumorales con receptores de superficie forman la base de la hipótesis de que algunos tumores persisten por medio de un mecanismo autocrino. La mayor concentración de receptores de factores del crecimiento, notificada en el caso de algunos tumores, puede hacer que las células de tumores sean más sensibles a la inducción del crecimiento por los factores correspondientes por medio de mecanismos paracrinos o autocrinos (12).

### **Potencial oncógeno de los factores del crecimiento**

No parece que los factores del crecimiento, solos o en conjunto, puedan inducir por sí mismos todo el fenotipo tumorígeno en células primarias. Sin embargo, una combinación de esos factores pueden hacer que las células no neoplásicas establecidas de roedores logren independencia con anclaje para fines de crecimiento, fenotipo que a menudo está muy relacionado en los fibroblastos con oncogenicidad (13). Ciertos factores del crecimiento pueden inducir independencia con anclaje y crecimiento tumorígeno de algunas células establecidas (14).

Los efectos oncógenos de los factores del crecimiento se han demostrado *in vivo*, pero sólo en circunstancias excepcionales. En una cepa de ratones con una elevada incidencia de tumores mamarios, cuyo continuo crecimiento depende en parte de un factor del crecimiento epidérmico, la extirpación quirúrgica de las glándulas salivales, que son la principal fuente del factor del crecimiento epidérmico endógeno, redujo de una manera significativa la incidencia de tumores mamarios (de 62 % a 12 %; 15). La administración de cantidades «farmacológicas» del factor del crecimiento epidérmico (5 µg por animal) en días alternados restituyó parcialmente (a 3 %) la incidencia normal de tumores. Esos resultados confirman que en esta estirpe de ratones la formación de tumores depende en parte del factor del crecimiento epidérmico. En otro experimento, al inocular simultáneamente a un ratón alopécico células independientes del estrógeno y células dependientes del estrógeno de tumores mamarios, éstas úl-

timas pasaron a depender de la hormona, quizá por la producción de factores del crecimiento autoestimulantes (16).

En los ejemplos anteriores, los factores del crecimiento fueron oncógenos en circunstancias en que los animales quizá tenían células muy anormales; la introducción de factores del crecimiento quizá representó sólo uno de varios cambios importantes que llevaron a la oncogénesis. El potencial oncógeno del virus del sarcoma de los simios parece ser sumamente limitado, pese a la expresión constitutiva de *v-sis* en células infectadas; cuando el virus no induce tumores, provoca formación de masas fibroblásticas de crecimiento lento que no parecen ser localmente invasivas ni forman metástasis (17).

#### Consideraciones cuantitativas

Aunque algunos factores del crecimiento pueden vincularse específicamente a las proteínas del suero, la mayoría parecen tener una vida media muy corta en la sangre (2 minutos en el caso del derivado de plaquetas). Una vida media corta limita mucho los efectos *in vivo*. La administración *in vivo* del factor del crecimiento transformador alfa a ratones recién nacidos (que son muy susceptibles a ese factor), en dosis subcutáneas diarias superiores a 0,3 µg/g de peso, aceleró la salida de los dientes incisores y la abertura de los párpados (conocidos efectos biológicos del factor del crecimiento epidérmico), pero con dosis superiores a 0,3 µg/g de peso no se observó ningún efecto en el estímulo del crecimiento (18). Por lo general se necesitan de 0,1 a 20 ng/ml de un factor del crecimiento para que pueda tener efectos importantes en las células susceptibles *in vitro*, aunque algunos, como el factor del crecimiento obtenido en fibroblastos, pueden ser activos en concentraciones de varios picogramos por mililitro.

Aun las células que segregan grandes cantidades de factores del crecimiento producen concentraciones máximas de 50 a 75 ng/ml de un factor determinado en el medio de cultivo. Por la dilución en los humores del cuerpo, sería casi imposible que la administración del material diluido que sobrenada tuviera cualquier actividad oncógena detectable *in vivo*. Sin embargo, pueden surgir varios problemas si los factores del crecimiento se concentran en el producto de interés. Parece razonable concluir de momento que una dosis de un factor del crecimiento de 10 µg diarios por kilogramo de peso no tendría ningún efecto oncógeno, aun en individuos sensibles. El sistema de tumores mamarios de los ratones (junto con la extirpación de las

glándulas salivales) podrían ser una medida provechosa para estudiar con más detalles las diferentes dosis del factor del crecimiento epidérmico o transformador alfa para obtener información más definitiva sobre los riesgos de la administración *in vivo* a un animal muy susceptible.

### Resumen y conclusiones

El riesgo teórico de las proteínas codificadas por oncógenos se limita a los factores del crecimiento que pueden ser segregados por células en las que se podría fabricar productos biológicos. Puesto que esos péptidos no se replican, su efecto es finito. Además, sus efectos son reversibles. De ordinario, los factores del crecimiento no parecen ser oncógenos. Aun en circunstancias en que contribuyen a la oncogénesis, parece que se necesita administrarlos repetidamente en elevadas concentraciones (varios microgramos por kilogramo) para que puedan servir de cofactores en el proceso carcinógeno y, al parecer, los tumores resultantes siguen dependiendo de la continua acción del factor del crecimiento respectivo para poder crecer.

### Referencias

1. BISHOP, J. M. Viral oncogenes. *Cell*, **42**: 23 (1985).
2. WEINBERG, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science*, **230**: 770 (1985).
3. LOWY, D. R. Potential hazards from contaminating DNA that contains oncogenes. *In vitro monograph*, **6**: 36 (1985).
4. CARPENTER, G. Y COHEN, S. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, **48**: 194 (1979).
5. ROBERTS, A. B. Y SPORN, M. B. Transforming growth factors. *Cancer surveys*, **4**: 683 (1985).
6. BAR-SAGI, D. Y FERAMISCO, J. R. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblast by *ras* proteins. *Science*, **223**: 1061 (1986).
7. SPORN M. B. Y ROBERTS, A. B. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *Journal of clinical investigation*, **78**: 329 (1986).
8. DEUEL, T. F. ET AL. Platelet derived growth factor: roles in normal and *v-sis* transformed cells. *Cancer surveys*, **4**: 633 (1985).
9. ROSS, R. ET AL. The biology of platelet derived growth factor. *Cell*, **46**: 155 (1986).
10. KOHASE, M. ET AL. Induction of Beta<sub>2</sub>-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*, **45**: 659-666 (1986).
11. DICKSON, R. B. ET AL. Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 $\beta$ -estradiol or *v-rasH* oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (en prensa).

12. ULRICH, A. ET AL. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* (Londres), **309**: 418 (1984).
13. ASSOIAN, R. K. ET AL. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* (Londres), **309**: 804 (1984).
14. ROSENTHAL, A. ET AL. Expression in rat fibroblast of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation. *Cell*, **46**: 301 (1986).
15. KURACHI, H. ET AL. Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 5940 (1985).
16. DANIELPOUR, D. Y SIRBASKU, D. A. New perspectives in hormone-dependent (responsive) and autonomous mamary tumour growth: role of autostimulatory growth factors. *In vitro*, **20**: 975 (1984).
17. DEINHARDT, F. Biology of primate retroviruses. En: Klein, G. ed. *Viral oncology*. Raven Press, 1980, págs. 357-398.
18. TAM, J. P. Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. *Science*, **229**: 673 (1985).