

# Biología molecular de los vectores adenovirales

Francisco Martínez-Flores,\* Fausto Alejandro Jiménez-Orozco,\*\*  
Hilda Villegas-Castrejón\*\*\*

## Resumen

La terapia con genes postula el uso terapéutico del DNA como una nueva alternativa de la biomedicina para el tratamiento de las enfermedades humanas. Todas las proteínas están codificadas en el DNA, y muchas enfermedades resultan de: a) la ausencia o expresión aberrante de uno o más genes; b) la ausencia de formas funcionales; c) alteraciones en su proceso de regulación, transporte o degradación. Por lo tanto, tales enfermedades pueden ser potencialmente tratadas, restableciendo la expresión de la proteína involucrada en las células afectadas. Sin embargo, para lograr una transferencia exitosa del material genético al sitio blanco y evitar la destrucción del DNA o del vehículo seleccionado antes de llegar al sitio de interés, se han desarrollado varios sistemas virales. Entre los virus más conocidos están: el virus del herpes simple, adenovirus tipo 5, virus adenoasociado y algunos retrovirus complejos (lentivirus). En este artículo se exponen las características biológicas, la manipulación genética y propiedades de los adenovirus, así como su empleo en la medicina actual como vectores para transferir genes y su potencial implicación en la terapia génica

**Palabras clave:** terapia génica, adenovirus, transcomplementación, transducción, plásmido.

## Summary

Gene therapy is based on the use of DNA as a therapeutic material as an alternative therapeutic tool for treatment of human diseases. All proteins are codified into the DNA and several diseases result from the absence or aberrant expression of one or related genes, absence of expression of functional proteins, and alterations for regulation process in transport and degradation mechanisms. In this regard, several diseases could be potentially treated through the expression of the normal form of the involved protein. However, the main objective is to achieve a successful genetic material delivery into the target site and avoid the destruction of DNA or the selected vehicle before arrival at the final destination. Several efficient viral gene transfer systems have been developed. Viral-mediated gene delivery for experimental models has been designed from herpes virus (HV), adenovirus (adenovirus), adeno-associated virus (AAV) and retroviruses (lentiviral vectors). In this review we will discuss the specific biological and cloning properties of adenoviral vectors as a gene transfer tool and potential medical implications for gene therapy.

**Key words:** gene therapy, adenoviral vectors, transcomplementation, gene delivery, plasmid.

## Introducción

La introducción de material genético exógeno para restaurar una función es la piedra angular de la terapia con genes en el tratamiento de las enfermedades humanas. Sin embargo, en los modelos *in vivo* existen limitaciones para lograr una transferencia exitosa del material genético al sitio blanco, como la destrucción del DNA o del vehículo seleccionado antes de llegar al sitio de interés.<sup>1-3</sup> Entre los sistemas para transferir genes, los vectores virales son el modelo más eficiente para la terapia génica.<sup>4-7</sup>

Los virus son entes de vida parásita celular obligada, cuyo principal objetivo en el curso de la evolución es infectar células con una gran especificidad sobre un tipo celular (tropismo). Son altamente eficientes para transferir su propio DNA a la célula huésped y promover la generación de nuevos viriones. El reemplazo de los genes necesarios para el inicio de la replicación (genes no esenciales) con otros genes de interés

\* Programa de Biomedicina, Departamento de Morfología Celular y Molecular, Centro Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

\*\* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

\*\*\* Programa de Biomedicina, Departamento de Morfología Celular y Molecular, Centro Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud.

### Solicitud de sobretiros:

Francisco Martínez-Flores,  
Departamento de Morfología Celular y Molecular,  
edificio IX, nivel 0, Centro Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud,  
Calz. México-Xochimilco 283, Col. Arenal de Guadalupe, 14389 México, D. F.  
Tel.: 5999 1000, extensiones 19105 y 19108.  
E-mail: fmartinef@gmail.com; fcomartinez@inr.gob.mx

Recibido para publicación: 14-03-2005

Aceptado para publicación: 01-06-2006

terapéutico, es empleado para la generación de vectores virales recombinantes, que pueden transducir el tipo celular para los que son normalmente infecciosos. Las modificaciones del genoma de varios tipos de virus han mejorado la eficiencia de la infección y la expresión de genes de interés para ser utilizados como vectores.

En general, durante la producción *in vitro* de vectores virales recombinantes, las proteínas derivadas de los genes no esenciales son provistas por transcomplementación, vía dos estrategias:

- Por una línea celular transformada de manera estable, la cual se denomina célula empaquetadora.<sup>8</sup>
- Por la cotransfección temporal del plásmido que provee los genes requeridos. Además, los vectores virales recombinantes pueden mantener o suprimir su capacidad de replicación (replicativos y no replicativos),<sup>9,10</sup> o inducir esta característica bajo circunstancias específicas (replicativos condicionados).<sup>11-13</sup>

Sin embargo, conocer los aspectos biológicos y moleculares de su interacción silvestre con células eucariontes ha colocado a los vectores adenovirales recombinantes como la herramienta más poderosa para la introducción de genes en diversos modelos terapéuticos de enfermedades humanas, así como la plataforma más eficiente para la generación de vacunas.<sup>14</sup>

## Métodos para la transferencia de genes

Existen varios métodos para la transferencia de genes, los cuales están clasificados en dos grupos:

- Métodos no virales.
- Métodos virales.

Los métodos no virales comprenden:

- a) Inyección directa o por biobalística *in situ* del plásmido que contiene el gene de interés.

- b) Métodos químicos como la precipitación con fosfato de calcio (sólo es eficiente *in vitro*).
- c) Encapsulación del DNA por micelas de lípidos catiónicos.
- d) Conjugación con polímeros inertes de alto peso molecular como DAE dextrán, polietilenglicol, o uso de polímeros para el plegamiento del DNA y encapsulado por micelas de lípidos catiónicos. Sin embargo, estos sistemas son poco eficientes en modelos *in vivo*.

Una nueva innovación tecnológica de los métodos no virales es la generación de nanopartículas poliméricas, las cuales son estructuras con carga positiva de alta afinidad por el DNA y que poseen alta afinidad por moléculas de superficie, y que internalizan el DNA.<sup>15,16</sup>

Los métodos virales comprenden el empleo de estructuras virales para la introducción de material genético hacia el interior de la célula. Entre estos virus se encuentran los DNA virus, como el adenovirus serotipo 3, 5, 6, y 7, los virus adenoasociados (serotipos 4, 5 y 6), el virus de la influenza, el rotavirus, los RNAvirus, como el virus de la leucemia murina, lentivirus y el herpes virus, entre los más empleados (cuadro I).

## Biología molecular del adenovirus

Los adenovirus fueron aislados por Rowe y colaboradores en 1953,<sup>17</sup> y se identificaron como el agente causal de infecciones del tracto respiratorio superior. Este mismo grupo de investigadores los identificó también como causantes de enfermedad en infecciones conjuntivales y del tracto urinario, lo que conllevó al inicio del conocimiento de su biología como agentes patógenos para aves, humanos y otros mamíferos. Actualmente se conocen 51 serotipos que infectan al humano (Ad1-Ad51), los cuales están clasificados en seis grandes subgrupos de la A a la F (cuadro II). Los serotipos del subgrupo C: Ad2, Ad5 y Ad7, son los mejor caracterizados desde el punto de vista molecular y genético.<sup>18</sup>

**Cuadro I.** Tipos de vectores virales. Principales familias de virus propuestos en la actualidad como vectores potenciales para la terapia con genes

Tipo	Tamaño del transgene/expresión	Tropismo celular
Virus del herpes simple tipo 1 (HSV 1)	1.5 kb/expresión permanente	Neuronas, células de la glia y células nerviosas periféricas
Adenovirus	1-11 kb/expresión transitoria	Células mesenquimáticas, epitelio pulmonar, epitelio intestinal
Retrovirus, Lentivirus	1-7 kb/expresión permanente	Células hematopoyéticas embrionarias y periféricas adultas, linfocitos
Virus adenoasociado	1.20 kb/expresión transitoria de larga duración	Células musculares (esqueléticas, cardíacas y lisas), condrocitos, fibroblastos y células epiteliales

**Cuadro II.** Clasificación de los *Mastadenovirus*. Taxonómicamente la familia *adenoviridae* se divide en dos géneros: *mastadenoviridae* y *aviadenoviridae*. El género *mastadenoviridae* incluye los subtipos humanos, simio, bovino, equino, porcino, ovino y canino

Subgrupo	Serotipo	Grupo por hemaglutinación
Adenovirus humano. Subgrupo A	12,18, 31	IV
Adenovirus humano. Subgrupo B	B1: 3, 7,16, 21, 50 B2: 11, 14, 34, 35	I
Adenovirus humano. Subgrupo C	1, 2, 5, 6	III
Adenovirus humano. Subgrupo D	8, 9, 10, 13, 15,17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	II
Adenovirus humano. Subgrupo E	4	III
Adenovirus humano. Subgrupo F	40, 41	III
Adenovirus de chimpancé	C1, C2, C5, C6, C7, C68	I

Patrones de aglutinación
I. Completa aglutinación de eritrocitos de mono
II. Completa aglutinación de eritrocitos de rata
III. Aglutinación parcial de eritrocitos de rata
IV. Poca o nula aglutinación

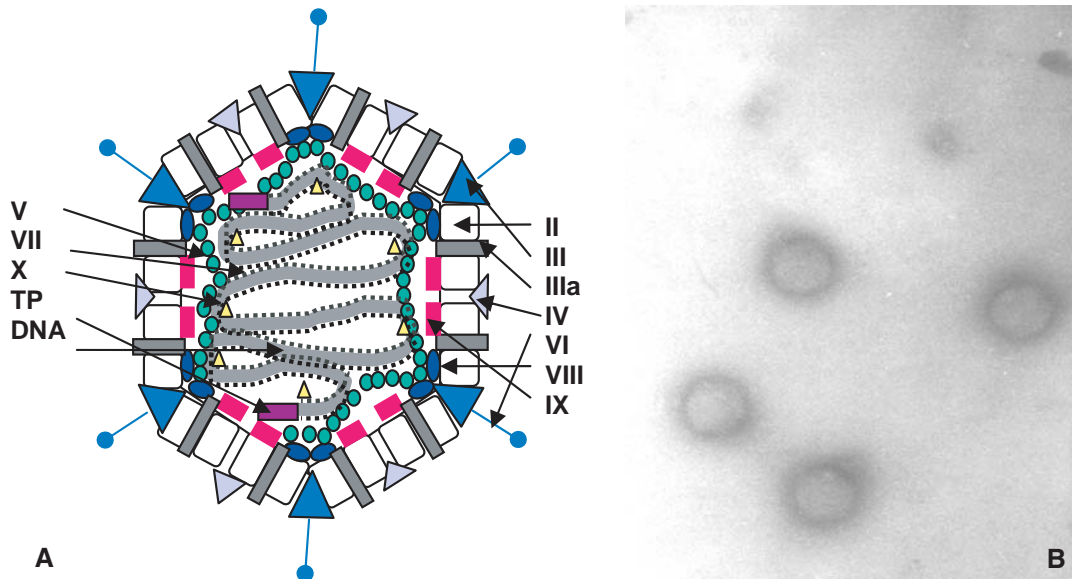
#### Estructura adenoviral

El adenovirus está constituido por una cápside externa, un núcleo proteico central que cubre al DNA lineal y varias proteínas accesorias. La cápside tiene una conformación icosaédrica (compuesta por 20 caras y 12 vértices) y está constituida por 252 subunidades o capsómeros, de los cuales 240 son hexones distribuidos en forma plana en las 20 caras; 12 son pentones que constituyen los vértices. Como su nombre lo sugiere, cada hexón o pentón está rodeado de cinco o seis unidades vecinas, respectivamente. El pentón está constituido por una base que forma parte de la superficie de la cápside y proyecta una fibra, con un extremo en forma de "perilla", conocido como fracción globular (figura 1). Los estudios comparativos de análisis electroforético de las proteínas de la cápside y los inicios de los marcos de lectura (ORFs) en el genoma, sugieren 11 tipos de proteínas estructurales. Estas proteínas se clasifican de manera convencional en números romanos (I a XI). Siete de estos polipéptidos constituyen la cápside, de los cuales el polipéptido II (de 967 aminoácidos) es el constituyente más abundante del virión. Cada hexón está formada a su vez por tres moléculas asociadas fuertemente de polipéptido tipo II. Los polipéptidos VI (217 aa), VIII (134 aa) y IX (139 aa) brindan estabilidad al capsómero, y los polipéptidos VI y VIII unen la cápside con el núcleo central del virión. Cinco unidades asociadas del polipéptido III (571 aa) forman la base del pentón. Entre éstas, el polipéptido IIIA (566 aa), se encuentra rodeando al pentón para

permitir su unión con el hexón adyacente, y también funciona como punto de unión entre el hexón y la proteína VII del núcleo central. El polipéptido IV (582 aa) forma la proteína fibrilar trimérica, la cual se proyecta en cada vértice del icosaedro. La unión de la base pentamérica y la fibra es denominada también capsómero-pentón. El núcleo del virión contiene cuatro proteínas básicas ricas en arginina, además de la existencia de dos copias del genoma viral en forma de DNA codificante. Los polipéptidos V (368 aa), VII (174 aa) y la proteína  $\mu$  (19 aa), son las tres proteínas que tienen contacto con el DNA. No se conoce la función de la proteína  $\mu$ , pero el polipéptido VII es el mayor constituyente del núcleo y realiza una función análoga a la histona, apareciendo como eje central alrededor del cual se enrolla el DNA. El polipéptido V se une a la base del pentón y funciona como punto de anclaje entre el núcleo y la cápside. Las cuatro proteínas presentes en el núcleo también son conocidas como proteínas terminales (PT) de 671 aa y se unen de manera covalente al extremo 5' del DNA.

#### Genoma adenoviral

El adenovirus-2 fue el primer serotipo en ser secuenciado y su genoma es de 35,937 pares de bases; posteriormente se caracterizó el adenovirus serotipo-5. Ambos genomas comparten 95 % de identidad,<sup>17</sup> excepto en las regiones codificantes para la proteína fibrilar. El DNA adenoviral tiene dos secuencias de repeticiones terminales invertidas de 100 a 140 pb. Las se-



**Figura 1.** A) Estructura de un adenovirus y proteínas que lo constituyen. B) Micrografía electrónica de un adenovirus mediante tinción negativa (X150K). Programa de Biomedicina, Departamento de Morfología Celular y Molecular, Centro Nacional de Rehabilitación, México.

cuencias de repeticiones terminales invertidas ubicadas en cada extremo del DNA lineal confieren la capacidad para aparear y circularizar el DNA viral durante la replicación. Además, contiene secuencias en *cis* que reconocen las proteínas de empaquetamiento, las cuales están localizadas a cientos de pares de bases y en el extremo terminal de la secuencia genómica. El cromosoma viral contiene:

- Cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4).
- Dos unidades tempranas retardadas (IX e IVa2).
- Una unidad tardía o tardía principal, la cual es procesada para generar cinco familias de RNA's tardíos (L1 a L5). Estos RNA's son procesados principalmente por RNA polimerasa III.

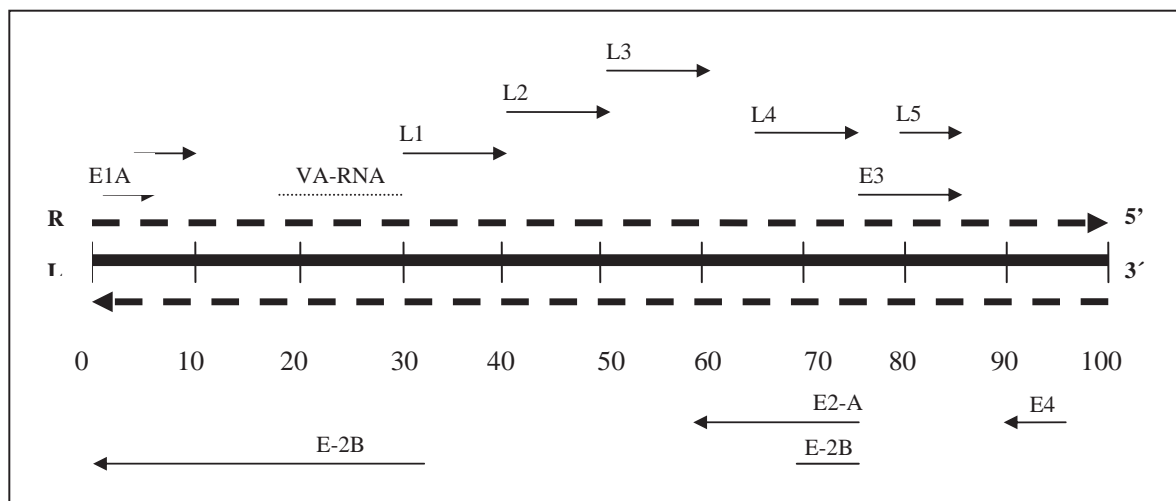
También contiene uno o dos genes VA-RNA que codifican para RNA's asociados a virus y que son procesados por la RNA polimerasa III. La secuencia de transcripción de genes de 5' a 3' involucra los genes E1A, E1B, IX, unidad ML tardío principal, VA-RNA para la cadena derecha (3' a 5') y para la cadena izquierda (3' a 5'), E4, E2 y IVa2 (figura 2).

## Replicación viral

En general, un ciclo de replicación viral comprende entre 20 y 24 horas, pero la expresión de las unidades transcripcionales tempranas inicia dos horas después de la adsorción.

## Adsorción y entrada

La adsorción o entrada del virus a la célula huésped es clásicamente un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Más de 85 % de los virus que alcanzan la superficie externa de la membrana celular es internalizado por esta vía. La unión del virus a la superficie celular es efectuada mediante la interacción de la fracción globular "knob" de la proteína fibrilar del pentón con el receptor CAR (*Receptor Coxsackie-Adenovirus*), localizado en la superficie externa de la célula blanco.<sup>19</sup> Una vez iniciado este primer paso, las proteínas de la base del pentón interactúan con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , las cuales a su vez inician el mecanismo de internalización por endocitosis. Este segundo evento del mecanismo de entrada se da por reconocimiento de la secuencia de arginina-glicina-aspartato de los cinco polipéptidos III de la base del pentón, la cual también está presente en otras moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina. La mutación en la secuencia arginina-glicina-aspartato disminuye la eficiencia de internalización del virus.<sup>20</sup> También se ha descrito un mecanismo de unión al dominio A1 de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (CMH-1).<sup>21</sup> Una vez dentro de la vesícula endocítica, el medio ácido favorece el proceso de desensamblaje de la cápside por cambios conformacionales de las proteínas inducidos por pH, liberando al complejo proteína/DNA. Al mismo tiempo, las proteínas de superficie desestabilizan la vesícula endocítica y permiten la liberación del complejo nú-



**Figura 2.** Organización del genoma adenoviral y su orientación para la transcripción. La localización corresponde a la nomenclatura en unidades de mapa (UM) que representa el total de pares de bases dividido entre 100.

cleo-proteico al espacio citoplásmico, y su posterior introducción al espacio nuclear mediante los poros de la membrana. La entrada al núcleo es facilitado por un fenómeno de deslizamiento sobre los microtúbulos y una vez en el núcleo se inicia el proceso de transcripción en dos etapas:

- Transcripción de genes tempranos.
- Transcripción de genes tardíos.

#### Transcripción del genoma adenoviral

Como su nombre lo indica, las unidades transcripcionales tempranas son las primeras en ser expresadas. Cada una codifica para un número de proteínas, cuyos RNA son transcritos por un solo promotor y posteriormente son editadas a través un proceso de empalme alterno.

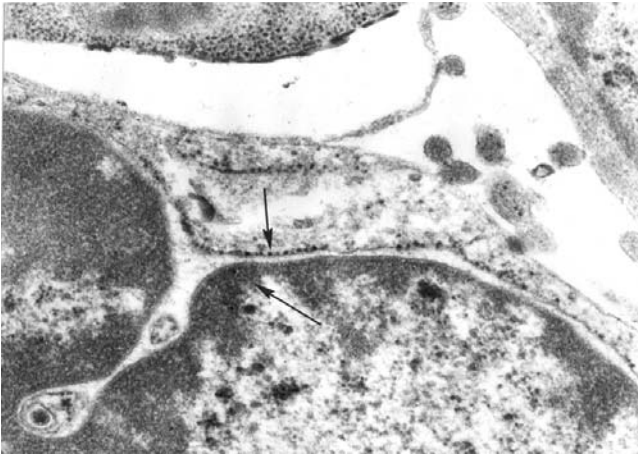
La subunidad *E1A* es la primera en ser transcrita, codifica para un factor indispensable para activar la transcripción de otros genes necesarios para la replicación viral, a través de secuencias TATA.<sup>22</sup> Esta activación transcripcional se lleva a cabo por dos proteínas codificadas en la subunidad *E1A*: las proteínas 12S y 13S. La expresión genética de este factor es controlada por un promotor constitutivo y no se han determinado los elementos que la activan/regulan, sin embargo, se sabe que interactúa con TBP a través de la interacción de dominios CR3 de la proteína 13S. La proteína 12S, a su vez, se une a Dr1, bloqueando su unión con TBP. Como resultado, ambas proteínas activan la transcripción a través de secuencias TATA y liberan la represión transcripcional. Este factor de transcripción también inhibe el efecto antiviral del interferón B.

La subunidad *E1B* codifica para dos proteínas que cooperan con los elementos *E1A*. La proteína *E1B1* modula la progre-

sión del ciclo celular. *E1B2* se une a la proteína p53 en su extremo aminoterminal y antagoniza su función proapoptótica.

La unidad transcripcional *E2* codifica para tres diferentes proteínas relacionadas directamente con la replicación del DNA viral.<sup>23</sup> *E2A* codifica para una proteína de unión a DNA de una sola cadena (DBP) y es requerido para la duplicación del DNA, tanto *in vivo* como *in vitro*. También se le ha atribuido funciones reguladoras de la transcripción. Los dos productos del gen *E2B*, adenovirus-DNA polimerasa y la proteína terminal TP, se acumulan en la célula infectada y son indispensables para la replicación viral. La adenovirus-DNA polimerasa presenta peculiaridades y semejanza a otras polimerasas encontradas en otros virus o eucariontes, sin embargo, en ensayos funcionales *in vitro* ninguna de estas polimerasas realiza la función de la adenovirus-DNA polimerasa silvestre, lo que sugiere fuertemente que su actividad está controlada por secuencias reguladoras dentro del genoma.

La unidad transcripcional *E3* se clasifica como no esencial en el cultivo y replicación *in vitro*, pero codifica para tres proteínas que modulan la respuesta inmune del huésped en presencia de infección.<sup>24</sup> Entre estas proteínas se encuentra una de 19 kD que se une a dos de los cuatro sitios de glicosilación del polipéptido de la cadena pesada del CMH durante su tránsito en el retículo endoplásmico y previene el transporte de los polipéptidos de CMH a la membrana celular. Esta regulación negativa disminuye el número de moléculas CMH en la superficie membranal y, por lo tanto, el reconocimiento antigénico de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos. Las proteínas de 14 kD y 10 kD inhiben la lisis de la célula infectada mediada por el factor de necrosis tumoral y se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), respectivamente.



**Figura 3.** Ensamblaje de viriones en el núcleo. Micrografía electrónica de una célula empaquetadora HEK-293 (x 24K). Nótese la diferencia de electrodensidad de los viriones en el citoplasma, la cual es dada por ensamblaje parcial o total. Las partículas más electrodensas representan viriones maduros (flechas) próximas al núcleo.

Entre las funciones de las proteínas codificadas en la *unidad transcripcional E4*,<sup>25</sup> se encuentran:

- La regulación transcripcional.
- El transporte del UNAM.
- La replicación del DNA viral.

También regula la transición entre la fase temprana y tardía de replicación. La expresión de los genes tardíos implica la síntesis de una serie de proteínas cuya principal función es la regulación de la síntesis proteica, el procesamiento postraduccional de proteínas estructurales y el ensamblaje de los nuevos viriones.

#### Ensamblaje viral

El proceso de ensamblaje viral se realiza en el núcleo y es un proceso complejo que inicia en el citoplasma con la formación del capsómero a partir de polipéptidos nacientes. La polimerización de los hexones en el citoplasma forma agregados proteicos con un peso molecular de 300 a 330 kD, los cuales involucran proteínas defectuosas. Los hexones tienden a formar agregados de manera natural, ya sea inmediato a su producción o a partir de lisados virales, donde interactúan varias proteínas estructurales y de fijado. Resulta interesante mencionar la participación de proteínas “defectuosas” como un fenómeno común para el ensamblaje de cápsides que no afectan el resultado final, ya que la unidad defectuosa funciona como andamiaje y estabilizador de la estructura de manera temporal, hasta ser sustituida por otra unidad funcional. Por lo anterior, se conocen dos tipos de cápsides durante el ensamblaje: la ligera y la pesada. Estas proteínas de andamiaje

se encuentran ausentes en la cápside final, que contiene, además, todas las proteínas que formarán el complejo núcleo-proteico. La inyección del DNA viral al interior de la cápside se realiza por un vértice abierto, desde el extremo izquierdo del DNA, el cual contiene una señal de empaquetamiento de 0.1 kb entre los primeros 400 pb del genoma y que sobrelapan con la subunidad E1A. En estudios de localización por microscopía electrónica se ha demostrado la presencia de viriones inmaduros y maduros en núcleo, pero los maduros e infectivos se encuentran principalmente en el citoplasma, lo que sugiere que la última fase de maduración involucra reacciones proteolíticas en el espacio nuclear (figura 3).

## Adenovirus como sistema de transferencia de genes

Las ventajas de los vectores adenovirales comparados con otros sistemas de transferencia de genes se basan en las siguientes características:

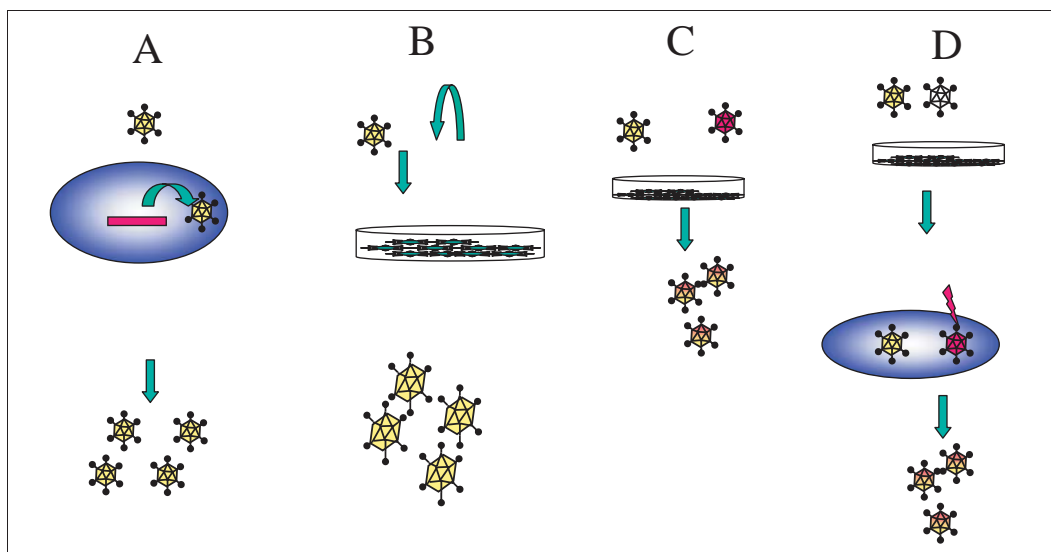
- 1) Amplio tropismo celular, salvo las células hematopoyéticas. Casi todas las estirpes celulares pueden ser infectadas por este virus.
- 2) Capacidad infectiva en células quiescentes o en cualquier fase del ciclo celular.
- 3) Versatilidad para ser inducidos como replicativos o no replicativos.
- 4) El tamaño del transgen puede ser de hasta 10 kb.
- 5) Nula o baja frecuencia de recombinación en el genoma del huésped.
- 6) Situación episomal del genoma.<sup>26</sup>
- 7) Expresión transitoria del gene de interés de hasta 60 días.
- 8) Relativa facilidad de producción y titulación en el laboratorio.

Por lo anterior, presenta cualidades que lo hacen ser un vector atractivo en diversas estrategias de terapia génica.

La potencial utilidad de los adenovirus como vectores naturales para transferir genes surge a partir de las observaciones y estrategias de Perricaudet y colaboradores.<sup>27</sup> Este grupo de investigadores demostró que el genoma sin la unidad E1, posee la misma capacidad infectiva que el virus silvestre, pero biológicamente es incapaz de replicarse. Con base en esta observación, se han diseñado diferentes estrategias para generar un adenovirus no replicativo.

#### Adenovirus no replicativos o defectuosos de replicación

Esencialmente, el genoma es cortado con una enzima de restricción que genera dos fragmentos; al que contiene la subunidad E1 se le conoce como brazo corto (de menor tamaño) y el resto del genoma es llamado brazo largo. Dentro del brazo



**Figura 4.** Estrategias usadas para la generación de adenovirus no replicativo o replicativo. Los genes tempranos no esenciales (E1), que inician los procesos de replicación son provistos por: A) Célula empaquetadora. B) Por otro vector o plásmido en una célula no transformada (replicativo). C) Creación de híbridos que se transcomplementan *in vitro*. D) Sistema de replicación condicionado a un activador externo, por ejemplo el sistema Cre-Lox-P inducido por tetraciclinas.

corto se elimina la subunidad E1, que se localiza en 1.3 a 11.2 unidades de mapa (MU) y es sustituida por el gen de interés que se desea expresar. Los extremos izquierdo y derecho a partir de la región deletada son llamados convencionalmente como brazo corto izquierdo y brazo corto derecho, respectivamente. La ulterior cotransfección del brazo corto (una vez clonado el gen de interés) y el brazo largo (DNA viral) en una célula empaquetadora genera dos eventos importantes:

- **Transcomplementación:** la célula empaquetadora (HEK-293 o HER-911, previamente transformada con el fragmento E1) provee de manera constitutiva los factores de transcripción requeridos para la replicación viral.
- **Recombinación:** un apareamiento de las secuencias homólogas de ambos brazos, dando origen a un genoma que en lugar de la subunidad E1 presenta la secuencia que codifica para el transgen de interés y que permite la consecuente producción y ensamblaje de viriones no replicativos.

Esta estrategia ha sido modificada y mejorada para incrementar su eficiencia. En la actualidad existen varios métodos para la generación de un adenovirus no replicativo, el más eficiente emplea la recombinación en bacterias y fue descrito por He y colaboradores en 1998.<sup>28</sup>

#### Producción de un adenovirus no replicativo

Como se ha mencionado previamente, las subunidad E1 es la región del genoma que se elimina en un sistema no replicativo.

Generalmente el sitio de inserción del gen exógeno es la región de las secuencias eliminadas (E1 o E4 para los vectores adenovirales de segunda generación), lo que resulta en vectores con una capacidad mayor para contener genes, hasta un máximo de 11 kb. La ausencia de la proteína E1A, que funciona como factor de inicio de transcripción, impide la replicación del virus. Sin embargo, tales factores pueden ser provistos en una célula previamente transformada con este gene como la línea celular HEK-293<sup>29</sup> o HER-911,<sup>30</sup> las cuales fueron desarrolladas a partir de células embrionarias de riñón humano y de retina, respectivamente. A partir de estas dos líneas celulares existen otros subtipos que han sido modificados para conferir características específicas en sistemas muy detallados, como HEK293-T, adenovirus HEK-293, AdS HEK-293, HER-911-E4, PER-C6, por lo que se les utiliza como células empaquetadoras o productoras de viriones a gran escala de manera rutinaria en la industria biotecnológica.

#### Adenovirus replicativo condicionado

Es un adenovirus que puede replicarse en presencia de un factor que modula la expresión de E1 o en su defecto que funcione como E1. Rancourt y colaboradores diseñaron los primeros sistemas de adenovirus replicativos condicionados en un modelo inducido por IL-6.<sup>12</sup> En este modelo, IL-6 fue capaz de funcionar como interruptor para iniciar la replicación de un adenovirus Del-E1A. Basado en este hallazgo, se han desarrollado sistemas que permiten la replicación viral en las células de inte-

rés de manera condicionada citólisis, y modelos aplicados a la terapia oncológica. Otras variables de esta estrategia son:

- La célula blanco es coinfectada por un adenovirus no replicativo con la consiguiente expresión del gen de interés.
- Un adenovirus no replicativo que es transcomplementado por un plásmido que le provee de la proteína E1A.
- Uso de otro virus (RV por ejemplo), cuya expresión E1 está controlada de manera externa por la presencia de promotores tejido específicos, la inducción por hormonas o factores de crecimiento, así como la activación mediada por la administración de antibióticos u otras drogas usadas en la práctica clínica (figura 4).

## Potencial terapéutico de los adenovirus para el tratamiento de enfermedades humanas

El potencial terapéutico de los vectores adenovirales se fundamenta en las características más estudiadas y exploradas para mejorar su eficiencia para introducir genes y se resumen en los siguientes puntos:

- *Modificación del tropismo viral.* Implica todas las estrategias para dirigir o seleccionar el sitio blanco a infectar.
- *Control transcripcional.* La modulación de la expresión del transgen.
- *Efecto citopático o citolítico.* El aspecto lítico del virus es objeto de interés para la destrucción de células tumorales.

### Modificación del tropismo viral

Debido a que el adenovirus puede infectar un gran número de estirpes celulares que expresan el receptor CAR, se han diseñado varias estrategias para lograr una infección específica o mejorar la eficiencia de infección en las células blanco, modificando genéticamente la estructura de la fibra del pentón o la utilización de anticuerpos dirigidos conjugados al receptor del adenovirus.

*Modificación de la fracción globular por secuencias arginina-glicina-aspartato.* Khrasnyk y colaboradores demostraron que la modificación de la secuencia de la fracción globular (Knob) de la proteína fibrilar agregando una secuencia arginina-glicina-aspartato resulta en incremento de la eficiencia de infección del virus y en interactuar directamente con las integrinas de la superficie celular de manera inicial y no secundaria, como en el ciclo normal de adsorción. El resultado es un incremento en la eficiencia de internalización no dependiente del número de receptores CAR.<sup>31</sup>

*Incorporación de ligandos flexibles y blancos específicos.* Esta estrategia implica el uso de secuencias de epítopes de ligandos de receptores de membrana tejido específicos. Las secuencias codificantes son incorporadas al genoma para ser

expresadas y ensambladas conjuntamente en la cápside viral, con el objeto de incrementar el tropismo del pentón y la proteína fibrilar, dirigiendo de manera más precisa el sitio blanco a infectar. La modificación del tropismo viral y variantes de movilidad de la fibra permiten una mayor flexibilidad y mejor interacción con el receptor membranal.<sup>32</sup> Desafortunadamente tiene la desventaja constante de utilizar o incorporar secuencias pequeñas que no alteren la estabilidad de la fibra y que, además, mantenga la integridad de la cápside y la capacidad infectiva.

*Conjugación con anticuerpos específicos.* La conjugación de la fracción globular del pentón con anticuerpos representa otro intento por dirigir el tropismo del virus, debido a que la modificación de la fibra y la fracción globular del pentón no puede realizarse de manera extensa sin comprometer la estabilidad e infectividad del virus. Douglas y colaboradores han demostrado que la fracción constante de un anticuerpo conjugado a la proteína globular y con una fracción FAB específica de un epítipo blanco de la superficie celular, puede modificar el blanco a infectar.<sup>33</sup> Esta estrategia ha demostrado la posibilidad de dirigir el tropismo viral hacia un blanco específico sin la manipulación genética y con una buena eficiencia en la expresión del transgen en células específicas. Esto permite la transferencia de genes en blancos celulares para los que normalmente el adenovirus no es infectivo hasta ahora en condiciones *in vitro*.

### Control transcripcional

El control transcripcional de los transgenes de interés dirigidos de manera externa o local ha generado entusiasmo en el área. Para lo cual se han empleado promotores tejido-específicos, o incluso el diseño de promotores sintéticos, así como inductores externos como antibióticos, hormonas o factores físicos. Entre ellos cabe destacar el uso de secuencias de respuesta a estrés físico (*egr-Krox1*), secuencias de reconocimiento a factores producidos por estrés oxidativo o daño tisular, y la represión de la transcripción controlada por sistemas sofisticados, como enzimas recombinasas expresadas en circunstancias patológicas o controlada por antibióticos como tetraciclinas, hormonas y péptidos que se encuentran de manera local o que se administran de manera sistémica.<sup>34</sup> Actualmente se diseñan virus cada vez más sofisticados y complejos que contienen secuencias silenciadoras o amplificadoras que evitan interferir con la expresión genética de la célula huésped.

### Efecto citopático

Dentro de la evolución normal de la infección y replicación del virus silvestre en la célula infectada, la fase final se caracteriza por la muerte de la célula; este fenómeno es conocido como efecto citopático o citólisis. Este fenómeno está condicionado por la incapacidad de la célula para restaurar la homeostasis intracelular en presencia de infección y dispara el mecanismo de muerte por apoptosis. La citólisis condicionada es usada en un modelo de replicación adenoviral controlada con adenovirus



ONIX-15.<sup>35-37</sup> El adenovirus ONIX-15 es un modelo de la replicación viral selectiva o condicionada en células tumorales. La replicación de este virus, también llamado oncolítico, se efectúa selectivamente en células tumorales que tienen una alteración en la regulación de la proteína p53, cuya mutación se encuentra presente en las células de varios tipos de cáncer. Sin embargo, esta replicación no se realiza en células sanas con p53 normal. Actualmente varios protocolos clínicos en oncología utilizan la citólisis para inducir muerte celular con la consiguiente regresión tumoral, entre los cuales destacan el cáncer de ovario, cáncer de cérvix, adenocarcinoma de estómago, carcinoma de próstata, cáncer de tiroides, de pulmón y colon, cáncer de partes blandas de cuello y gliomas.<sup>35-40</sup>

## Viroterapia en cáncer de cérvix

Una forma de emplear la actividad citolítica del adenovirus generada por su replicación ha originado un nuevo término en oncológica: la viroterapia oncolítica. Recientemente Hadeiman y colaboradores han reportado la generación de un adenovirus con capacidad replicativa condicionada por la presencia de la proteína E6 en células con estadios clínicos tempranos de CaCu.<sup>39</sup> La infección por el virus del papiloma humano, principalmente del serotipo 16 y 18, está asociada causalmente con su oncogénesis. Se sabe que la expresión persistente de los oncogenes virales E6 y E7 interactúa con la maquinaria de la célula infectada vía p53 y la proteína Rb, permitiendo el desarrollo de la neoplasia. Los vectores replicativos condicionados (CRAdS) representan un nuevo instrumento de la viroterapia para el tratamiento selectivo de este cáncer.

Este modelo ha demostrado alta eficiencia de infección en las células deseadas pero también en un número menor de células vecinas. Sin embargo, la replicación selectiva sólo se efectúa en las células que expresan el oncogen viral. La replicación permisiva en las células tumorales genera un efecto citotóxico que culmina en muerte de la célula tumoral. Este modelo ha demostrado matar a las células tumorales de manera específica en neoplasias intraepiteliales (NIC) *in vivo*.

Además, la mayor ventaja de este modelo es su efecto de muerte tumoral sinergizada por la sobreexpresión de la proteína proapoptótica p53, la cual es transferida por el mismo virus.

Estos estudios se están evaluando en fases clínicas I y II (seguridad, toxicidad y escalamiento de dosis), así como la evaluación de parámetros farmacocinéticos del vector administrado por vía intravenosa.

## Otras estrategias

En un intento por mejorar la eficiencia en la transferencia de genes mediados por virus, se han diseñado los *minivirus* derivados de adenovirus, también denominados "gutless".<sup>26</sup> Estos viriones están constituidos por cápsides completas con el mínimo contenido de genoma viral, el cual contiene secuencias de repeticiones

terminales invertidas y secuencias de empaquetamiento que flanquean el gen exógeno. Esta versión del adenovirus permite:

- La incorporación de transgenes de mayor tamaño en relación al que transfiere un adenovirus no replicativo.
- Una mayor expresión del gen deseado.
- Una reducida citotoxicidad y baja inmunogenicidad en el huésped.

## Limitaciones clínicas del uso de vectores adenovirales y perspectivas

A pesar de que los vectores adenovirales son sistemas de transferencia viral altamente eficientes y tienen varias ventajas sobre otros virus, en la práctica clínica aún presentan varias limitaciones. Por ejemplo, algunas estrategias terapéuticas requieren una administración repetida del virus con el objeto de prolongar el tiempo de expresión del transgene deseado. Desafortunadamente, la exposición continua del virus genera una respuesta inmune secundaria.<sup>41,42</sup> Desde el punto de vista inmunológico, después de su administración al torrente circulatorio, el adenovirus es eliminado de la circulación sistémica hasta en 90 % en hígado, por procesos no inmunológicos durante las primeras 24 horas.<sup>43</sup> Esta depuración es efectuada principalmente por macrófagos tisulares hepáticos y la fracción restante puede potencialmente llegar al sitio blanco (equivalente a la fracción biodisponible de cualquier fármaco). Por otro lado, las células CD4 activadas producen factor de necrosis tumoral alfa con la consiguiente activación del sistema inmune y la producción de anticuerpos neutralizantes. Más tarde, las células infectadas son eliminadas por células CD8 y linfocitos T citotóxicos en el transcurso de aproximadamente 60 días y, por consiguiente, la pérdida de la expresión del transgene.

Diversos intentos clínicos por disminuir la respuesta inmune del vector y prolongar la expresión del gene transducido, han requerido la asociación de terapias inmunosupresivas basadas principalmente en el empleo de corticosteroides durante el tiempo de suministro del virus sin un éxito sustancial en los modelos *in vivo*.<sup>44,45</sup> A este respecto, varios modelos experimentales *in vivo* proponen el uso de adenovirus conjugados a polímeros inertes como polietilenglicol, polibreno o la conjugación con lípidos catiónicos inertes, con el fin de disminuir el contacto directo de proteínas virales con células del sistema inmune.<sup>46</sup> Los resultados obtenidos en modelos murinos y en primates son muy alentadores y actualmente se estudian nuevas estrategias para modificar la inmunogenicidad del virus. Esta respuesta también se usa como plataforma para amplificar la respuesta inmunológica de las vacunas, debido a la fuerte respuesta inmunológica generada contra el adenovirus; nuevos modelos para la generación de vacunas con alta efectividad se emplean a propagar en el mundo industrial.<sup>14,47,48</sup>

El impacto de la tecnología de los vectores virales en la industria biotecnológica ha permitido y financiado el desarrollo de estudios farmacocinéticos precisos y de los efectos adversos a largo plazo

**Cuadro III.** Enfermedades humanas con protocolos de terapia génica mediados por adenovirus

Enfermedades monogénicas hereditarias	Oncología	Enfermedades crónicas degenerativas
Fibrosis quística primaria	Cáncer de colon	Enfermedad de Parkinson
Hemofilia	Cáncer de ovario	Enfermedad de Alzheimer
Deficiencia de DAC	Carcinoma de pulmón	Neuroprotección
Diabetes mellitus tipo I	Glioblastoma multiforme	Hepatoprotección/transplante
	Cáncer de estómago	Inmunoprotección
	Melanoma	
	Cáncer de partes blandas de cuello y cabeza	

para su uso en humanos. Por ello, se ha creado una serie de lineamientos para la buena práctica en su manufactura<sup>49</sup> y garantizar la seguridad biológica de su aplicación terapéutica, así como el establecimiento de los criterios clínicos y éticos para su producción *in vitro*, manejo y administración clínica. Esta normatividad ha sido establecida por un consorcio de científicos de la rama académica, industrial y gubernamental de cada país, con el fin de respaldar su utilidad en las enfermedades humanas como cáncer, hemofilia, distrofias musculares, enfermedades del sistema cardiovascular, crónicas degenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus) o autoinmunes, e incluso en la preservación de órganos para trasplantes, así como la ingeniería de tejidos a partir de tejidos indiferenciados y la generación de vacunas (cuadro III).<sup>50</sup> Los resultados terapéuticos obtenidos en las diversas aplicaciones clínicas alientan a seguir desarrollando el vector adenoviral ideal para su empleo en humanos. Éste debe tener la máxima eficiencia en la transferencia de genes en la célula blanco (infección sitio-dirigida), expresión modulable del gen deseado (transcripción tejido-específico) y causar los mínimos o nulos efectos en la actividad transcripcional de la célula huésped y efectos adversos sistémicos (inmunogenicidad). A este respecto es necesario estudiar los efectos y las interacciones de regulación transcripcional del genoma viral con la maquinaria transcripcional y traduccional de la célula huésped, y rediseñar los vectores virales disponibles en la actualidad, con el objeto de acercarnos cada vez más al vector ideal para uso terapéutico humano.

### Agradecimientos

Este artículo fue apoyado por el programa PAPPIT IN220606 de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Referencias

- Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J. The efficient expression of intravascular delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther* 1998;5:272-276.
- Alio SF. Long term expression of the human alpha1 antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector. *Biochem Pharmacol* 1997;54:9-13.
- Ueno NT, Bartholomeusz C, Xia W, Anklesaria P, et al. Systemic gene therapy in human xenograft tumor models by liposomal delivery of the E1A. *Gen Cancer Res* 2002;62:6712-6716.
- Thirion C, Laroche N, Volpers C, et al. Strategies for muscle specific targeting of adenoviral gene transfer vectors. *Neuromusc Disord* 2002;Suppl 1:S30-39.
- Chao H, Walsh CE. AAV vectors for hemophilia B gene therapy. *Mt Sinai J Med* 2004;5:305-313.
- Andreansky S, He B, Gillespie GY, et al. The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;93:11313-11318.
- MacKenzie MJ. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2004;9:541-549.
- Graham FL, Smiley J, Russell WL, Nairn R. Characterization of a human cell line transformation by DNA from adenovirus 5. *Gen Virol* 1995;36:59-72.
- Kim S, Lin H, Barr E, Chu, L, Leiden JM, Parmacek MS. Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells in vivo. *J Clin Invest* 1997;100: 1006-1014.
- Aleman R, Lai S, Lou YC, Jan HY, Fang X, Zhang WW. Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Ther* 1999;1:21-25.
- Gómez-Navarro J, Curiel DT. Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Lancet Oncol* 2000;1:148-158.
- Rancourt C, Piche A, Gomez-Navarro J, et al. Interleukin-6 modulated conditionally replicative adenovirus as an antitumor/cytotoxic agent for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999;5:43-50.
- Zhu ZB, Chen Y, Makhija SK, Lu B, Wang M, Rivera AA, et al. Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 2006;29:1319-1329.
- Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 2004;4:616-629.
- Kommareddy S, Tiwari SB, Amiji MM. Long circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol Cancer Res Treat* 2005;4:6:615-625.
- Kang HC, Lee M, Bae HY. Polymeric gene carriers. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 2005;15:317-342.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;3:570-573.

18. Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 1992;1:280-285.
19. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie virus B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-1323.
20. Wickham TJ, Carrion ME, Kovsdi I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 1995;10:750-756.
21. Hong S, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class Ia2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 1997;16:2294-2306.
22. Van Ormondt H, Maat J, van Beveren CP. The nucleotide sequence of the transforming early region E1 of adenovirus type 5 DNA. *Gene* 1980;3-4:299-309.
23. Aronheim A, Shiran R, Rosen A, Walker MD. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;17:8063-8067.
24. Stewart AR, Tollefson AE, Krajcsi P, Yei SP, Wold WS. The adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor necrosis factor and to down-regulate the epidermal growth factor receptor, are localized in the plasma membrane. *J Virol* 1995;69:172-181.
25. Kaplan JM, Armentano D, Scaria A, et al. Novel role for E4 region genes in protection of adenovirus vectors from lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1999;73:4489-4492.
26. Kreppel F, Kochanek S. Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol* 2004;78:9-22.
27. Perricaudet M. Molecular biology of the transforming region of human type 5 adenovirus. *Biochimie* 1983;65:III-VI.
28. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514.
29. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
30. Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, et al. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996;7:215-222.
31. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, et al. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998;72:9706-9713.
32. Van Beusechem VW, van Rijswijk AL, van Es HH, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR. Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther* 2000;7:1940-1946.
33. Douglas JT, Miller CR, Kim M, et al. A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotech* 1999;17:470-475.
34. Li ZB, Zeng ZJ, Chen Q, Luo SQ, Hu WX. Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:66.
35. Reid TR, Freeman S, Post L, McCormick F, Sze DY. Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin. *Cancer Gene Ther* 2005;8:673-681.
36. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3:639-645.
37. Liu X, Gu J, Shi W. Targeting gene-virotherapy for cancer. *ABBS* 2005;37:581-587.
38. Seok K, Engler J, Joung I. Enhancement of gene delivery to cancer cells by a retargeted adenovirus. *J Microbiol* 2005;43:179-182.
39. Heideman D, Steenbergen R, van der Torre J, et al. Oncolytic adenovirus expressing a p53 variant resistant to degradation by HPV E6 protein exhibits and selective replication in cervical cancer. *Mol Ther* 2005;12:1083-1090.
40. Boucher P, Shewach D. In vitro and in vivo enhancement of ganciclovir-mediated bystander cytotoxicity with gemcitabine. *Mol Ther* 2005;12:1064-1071.
41. Bessis N, Garcia Cozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 2004;11:Suppl 1:S10-17.
42. Hodges B, Taylor K, Chu Q, et al. Local delivery of a viral vector mitigates neutralization by antiviral antibodies and results in efficient transduction of rabbit liver. *Mol Ther* 2005;12:1043-1051.
43. Yang Y, Wilson JM. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I restricted CD4+ CTLs in vivo. *J Immunol* 1995;155:2564-2569.
44. Lin T, Gu J, Zhang L, et al. Enhancing adenovirus-mediated gene transfer in vitro and in vivo by addition of protamine and hydrocortisone. *J Gene Med* 2003;5:868-875.
45. Eto Y, Gao JQ, Sekiguchi F, Kurachi S, Katayama K, Maeda M, et al. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* 2005;7:604-612.
46. Rocha CD, Caetano BC, Machado AV. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol* 2004;7:83-94.
47. Lemckert AA, Sumida SM, Holterman L, Vogels R, Truit DM, Lynch DM, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. *J Virol* 2005;79:9694-9701.
48. Basak SK, Kiertscher SM, Harui A, Roth MD. Modifying adenoviral vectors for use as gene-based cancer vaccines. *Viral Immunol* 2004;17:182-196.
49. Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotech Adv* 2003;20:475-478.
50. Zhou D, Ertl HC. Therapeutic potential of adenovirus as a vaccine vector for chronic virus infections. *Exp Opin Biol Ther* 2006;6:63-72.

