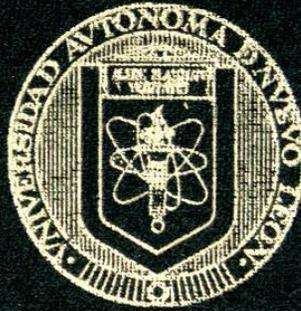


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTOS TOXICOLOGICOS DE VECTORES
ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA

Por

ESTHER MAGDALENA MARQUEZ LONA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

2003

TM
QR396
.M3
c.1

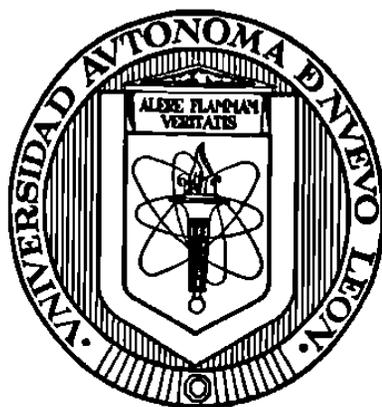
ESTHER MARGDARENA MARQUEZ LONNA



1080079922

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS
DE RATA**

Por

ESTHER MAGDALENA MÁRQUEZ LONA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

2003



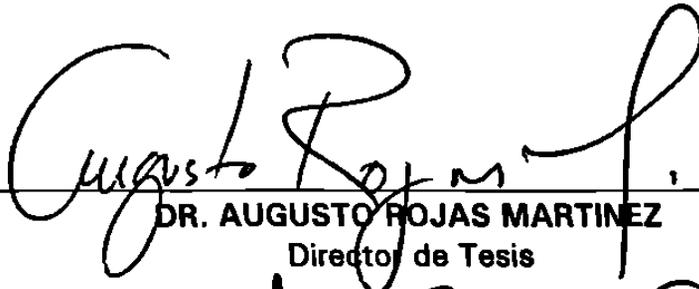
TM
QR396

.M3



**EFFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES
EN FETOS DE RATA**

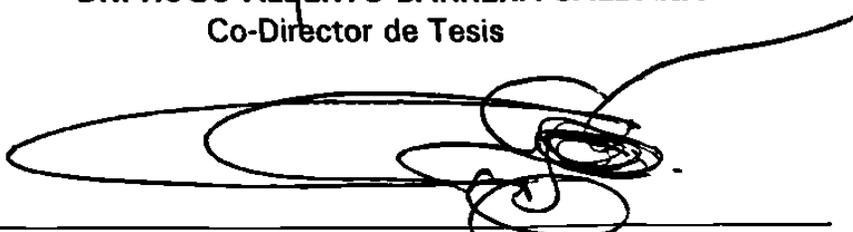
Aprobación de la Tesis:



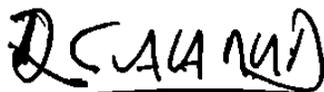
DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



MVZ. M.C. HECTOR GERARDO LOZANO GARZA
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y bajo la co-asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y el M en C. Héctor Gerardo Lozano Garza.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud al Dr. Augusto Rojas Martínez por su confianza en el desarrollo de este nuevo proyecto en un área desconocida y fascinante. Por su paciencia, tutoría y sobre todo por la calidad humana y el respeto.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Hugo Barrera Saldaña por haberme permitido el ingresar al programa de postgrado, por su asesoría y guía.

Al Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, por permitir el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Gerardo Lozano Garza por la confianza, la amistad y sobre todo el apoyo incondicional a todo lo largo de este proyecto.

A la Clínica No.34 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en especial al Dr. Jesús Ojeda Ibarra por todo el apoyo y excelentes consejos, así como todo el excepcional análisis patológico realizado para esta tesis.

Al Departamento de Bioquímica y en especial a la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A mis padres por todo el amor y el apoyo incondicional. A mis hermanos por ser los mejores del mundo.

A todos y cada uno de mis familiares por sus porras y consejos.

A mis amigos de Guanajuato, Monterrey y de la UCI, por tanto cariño y por todas las parrandas.

A DIOS, por la oportunidad de vivir y ser bendecida con la amistad y el amor.

A ti mi abuelo, siempre en mi corazón.

I have a dream.

RESUMEN

Esther Magdalena Márquez Lona

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Agosto del 2003.

Área de Estudio: Terapia Génica.

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 89.

Título del Estudio: "EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA".

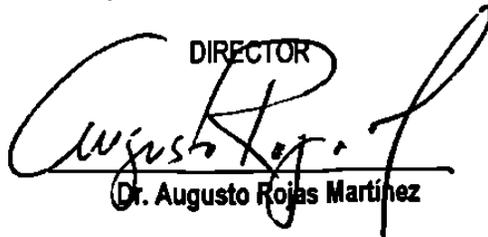
Objetivo: El presente trabajo es un proyecto de investigación pre-clínica sobre los efectos tóxicos de la terapia génica intrauterina, en el cual se investigaron los posibles efectos toxicológicos de vectores adenovirales en productos y madres de la especie *Ratus norvegicus* transducidos por la vía sistémica materna (inyección endovenosa) y por la vía intra-amniótica, durante estadios tardíos del proceso de embriogénesis.

Material y Métodos: Después de la determinación citológica de la copulación, grupos experimentales de ratas madre fueron transducidas con el vector adenoviral AdV-CMV- β gal (vector basado en el serotipo 5 humano), el cual codifica para la enzima bacteriana β -galactosidasa. Las ratas y productos del grupo control recibieron solución salina. Las transducciones con vector (o el tratamiento con solución salina en los controles) se realizaron a los 12 y 15 días post-coito (d.p.c.). Las transducciones se hicieron por dos vías: 1) en la ruta sistémica, las ratas recibieron una dosis endovenosa (i.v., inyección en vena de la cola) de 1×10^{11} partículas de vector (p.v.) y el grupo control recibió solución salina. Para la transducción por la vía intra-amniótica (i.a.), las madres fueron sometidas a laparotomía y la mitad de los productos fueron transducidos con una dosis de 1×10^{10} p.v., mientras que los productos restantes (controles) fueron transducidos con un volumen similar de solución salina. Las madres fueron sacrificadas al 19 d.p.c. para determinar la transducción de órganos maternos y fetales mediante la tinción para X-gal y determinar lesiones malformativas, tóxicas o inflamatorias.

Resultados: En todos los fetos analizados el intestino fue el órgano más transducido (++++), siendo también positivos el cordón umbilical y el amnios. Los fetos transducidos vía i.a. también mostraron transducción en retroperitoneo (+++), pulmón (+++), glándulas suprarrenales (++) y piel (+). Los embriones a estadios medios de gestación manifestaron una sensibilidad extrema a la administración i.a. del vector y a las cargas virales altas, registrándose muerte in-útero hasta en un 70% a 12 d.p.c. En ambas rutas de administración se observó en las madres positividad para β -galactosidasa en hígado, riñón, bazo, cuernos uterinos, etc., destacándose la observación de transducción en encéfalo por las dos vías ensayadas y de ovarios en la ruta i.a. Adicionalmente, en las madres pudo establecerse el desarrollo de una respuesta inmune moderada (+), con presencia de macrófagos y linfocitos, sin el desarrollo de alteraciones morfológicas, ni procesos patológicos en los órganos estudiados. La manipulación a 12 d.p.c. se asoció a alto índice de mortalidad materna (25%).

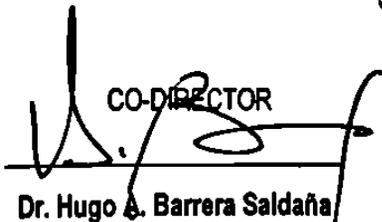
Contribuciones y Conclusiones: Se estableció que a las dosis y estadios probados no existe una relación directa entre malformación y transducción adenoviral en productos expuestos aún en embriogénesis activa. Se evidenció la transducción adenoviral en varios órganos fetales (cordón umbilical, amnios e intestino por vía i.v. y cordón umbilical, amnios, intestino, retroperitoneo, pulmón, piel y glándulas suprarrenales por vía i.a.) y transducción por ambas vías en varios órganos maternos (cuernos uterinos, riñón, hígado, pulmón y bazo), resaltándose la transducción del encéfalo (ambas vías) y de ovarios (vía intra-amniótica).

DIRECTOR



Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-DIRECTOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CO-DIRECTOR



MC. Héctor Gerardo Lozano Garza

RESUMEN

Esther Magdalena Márquez Lona

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Agosto del 2003.

Área de Estudio: Terapia Génica.

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 89.

Título del Estudio: "EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA".

Objetivo: El presente trabajo es un proyecto de investigación pre-clínica sobre los efectos tóxicos de la terapia génica intrauterina, en el cual se investigaron los posibles efectos toxicológicos de vectores adenovirales en productos y madres de la especie *Ratus norvegicus* transducidos por la vía sistémica materna (inyección endovenosa) y por la vía intra-amniótica, durante estadios tardíos del proceso de embriogénesis.

Material y Métodos: Después de la determinación citológica de la copulación, grupos experimentales de ratas madre fueron transducidas con el vector adenoviral AdV-CMV- β gal (vector basado en el serotipo 5 humano), el cual codifica para la enzima bacteriana β -galactosidasa. Las ratas y productos del grupo control recibieron solución salina. Las transducciones con vector (o el tratamiento con solución salina en los controles) se realizaron a los 12 y 15 días post-coito (d.p.c.). Las transducciones se hicieron por dos vías: 1) en la ruta sistémica, las ratas recibieron una dosis endovenosa (i.v., inyección en vena de la cola) de 1×10^{11} partículas de vector (p.v.) y el grupo control recibió solución salina. Para la transducción por la vía intra-amniótica (i.a.), las madres fueron sometidas a laparotomía y la mitad de los productos fueron transducidos con una dosis de 1×10^{10} p.v., mientras que los productos restantes (controles) fueron transducidos con un volumen similar de solución salina. Las madres fueron sacrificadas al 19 d.p.c. para determinar la transducción de órganos maternos y fetales mediante la tinción para X-gal y determinar lesiones malformativas, tóxicas o inflamatorias.

Resultados: En todos los fetos analizados el intestino fue el órgano más transducido (++++), siendo también positivos el cordón umbilical y el amnios. Los fetos transducidos vía i.a. también mostraron transducción en retroperitoneo (+++), pulmón (+++), glándulas suprarrenales (++) y piel (+). Los embriones a estadios medios de gestación manifestaron una sensibilidad extrema a la administración i.a. del vector y a las cargas virales altas, registrándose muerte in-útero hasta en un 70% a 12 d.p.c. En ambas rutas de administración se observó en las madres positividad para β -galactosidasa en hígado, riñón, bazo, cuernos uterinos, etc., destacándose la observación de transducción en encéfalo por las dos vías ensayadas y de ovarios en la ruta i.a. Adicionalmente, en las madres pudo establecerse el desarrollo de una respuesta inmune moderada (+), con presencia de macrófagos y linfocitos, sin el desarrollo de alteraciones morfológicas, ni procesos patológicos en los órganos estudiados. La manipulación a 12 d.p.c. se asoció a alto índice de mortalidad materna (25%).

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció que a las dosis y estadios probados no existe una relación directa entre malformación y transducción adenoviral en productos expuestos aún en embriogénesis activa. Se evidenció la transducción adenoviral en varios órganos fetales (cordón umbilical, amnios e intestino por vía i.v. y cordón umbilical, amnios, intestino, retroperitoneo, pulmón, piel y glándulas suprarrenales por vía i.a.) y transducción por ambas vías en varios órganos maternos (cuernos uterinos, riñón, hígado, pulmón y bazo), resaltándose la transducción del encéfalo (ambas vías) y de ovarios (vía intra-amniótica).

DIRECTOR

Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-DIRECTOR

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CO-DIRECTOR

MC. Héctor Gerardo Lozano Garza

CONTENIDO

Resumen	1
Índice de figuras	4
Índice de tablas	6
Lista de abreviaturas	7
I. INTRODUCCIÓN	9
I.I. Adenovirus	9
I.I.I. Aspectos generales	9
I.I.II. Patogenia adenoviral	9
I.I.III. Estructura y replicación	10
I.I.IV. Vectores adenovirales de replicación deficiente	11
I.I.V. Transferencia génica prenatal	12
II. ANTECEDENTES	14
II.I. Infecciones virales	15
II.II. Transducciones virales para terapia génica intrauterina	16
II.III. La rata como modelo experimental para terapia génica intrauterina	24
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. ESTRATEGIA	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
V.I. Origen de los reactivos	31
V.II. Citología vaginal exfoliativa	32
V.III. Tinción de Papanicolaou	33
V.IV. Transducción adenoviral	33
V.IV.I. Transducción intravenosa (i.v.)	34
V.IV.II. Transducción intra-amniótica (i.a.)	35
V.V. Análisis anatomopatológico	35
V.V.I. Tinción con hematoxilina y eosina	36
V.V.II. Tinción para X-gal y rojo rápido nuclear	37
V.V.III. Inmunohistoquímica	37
VI. RESULTADOS	40
VI.I. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral	40
VI.II. Conformación de los grupos experimentales	42
VI.III. Laparotomía exploratoria (estudio piloto con una rata)	43
VI.IV. Escalamiento de la dosis viral	45
VI.V. Transducción intravenosa (i.v.)	49
VI.V.I. Análisis anatomopatológico	50
VI.V.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre	51
VI.V.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos	51
VI.VI. Transducción intra-amniótica	56

VI.VI.I. Análisis anatomopatológico	62
VI.VI.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre	62
VI.VI.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos	67
VII. DISCUSIÓN	72
VII.I. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral	72
VII.II. Conformación de los grupos experimentales	72
VII.III. Estudio piloto	73
VII.IV. Escalamiento de la dosis viral	74
VII.IV.I. Transducciones intra-amnióticas	74
VII.V. Transducción intravenosa	75
VII.VI. Transducción intra-amniótica	76
VIII. CONCLUSIONES	80
IX. BIBLIOGRAFÍA	8x
APÉNDICE A. Embriogénesis de la rata	82
APÉNDICE B. Ciclo estral de la rata	87
APÉNDICE C. Control del medio ambiente para el modelo experimental	88
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	97

FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de un adenovirus	10
Figura 2. Esquema de la estrategia general	30
Figura 3. Técnica de citología vaginal exfoliativa	32
Figura 4. Ciclo estral de la rata	43
Figura 5. Laparotomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos	38
Figura 6. Cierre de heridas quirúrgicas y recuperación post-operatoria	39
Figura 7. Frotis vaginales teñidos por la técnica de Papanicolaou	41
Figura 8. Fetos extraídos de los cuernos uterinos a los 20 d.p.c.	44
Figura 9. Fetos con anomalías en el estudio piloto	45
Figura 10. Transducción de órganos maternos y fetales	46
Figura 11. Análisis de la transducción i.v. para β -gal a 12 d.p.c.	49
Figura 12. Testículo. Tinción H/E	52
Figura 13. Intestino delgado. Tinción X-gal	52
Figura 14. Comparación de la eficiencia de transducción fetal	53

Figura 15. Glándula suprarrenal fetal. Transducción i.v. Tinción H/E	54
Figura 16. Piel. Transducción i.v. Tinción H/E	55
Figura 17. Muerte in-útero.	59
Figura 18. Relación de pesos en los estadios de transducción	60
Figura 19. Relación de medidas en los estadios de transducción	61
Figura 20. Lesiones en fetos afectados por la transducción i.a.	62
Figura 21. Órganos maternos teñidos para β-galactosidasa	64
Figura 22. Transducción en cerebro materno (vía i.a.). Tinción X-gal	65
Figura 23. Transducción en ovario materno (vía i.a.). Tinción X-gal	66
Figura 24. Diversos tejidos fetales transducidos (vía i.a.). Tinción H/E	68
Figura 25. Fetos transducidos i.a. a los 15 d.p.c. Tinción X-gal	69
Figura 26. Funcinitis aguda. Tinción H/E	70

TABLAS

Tabla 1. Agentes virales implicados en patología embrionaria y fetal humana	15
Tabla 2. Efectos teratogénicos producidos por bunyavirus	16
Tabla 3. Estudios preclínicos de terapia génica gestacional	17
Tabla 4. Efectos de la transducción viral en modelos animales en etapas gestacionales tempranas	20
Tabla 5. Distribución de la expresión en ensayos preclínicos de terapia génica intrauterina con vectores adenovirales	21
Tabla 6. Modelación in vivo con administración a órgano blanco	22
Tabla 7. Efectos tóxicos e inmunológicos de la transducción intrauterina	23
Tabla 8. Hallazgos en la transducción i.v.	56
Tabla 9. Resumen de hallazgos en fetos transducidos	58
Tabla 10. Hallazgos en la transducción i.a.	71

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AdE1⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E1
AdE3⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E3
Al₂(SO₄)₃	Sulfato de aluminio
CD 4	Linfocitos CD4
CD 8	Linfocitos CD8
CMV	Citomegalovirus
CAG	Citosina, adenina y guanina
d.p.c.	Días post-coito
d.p.t.	Días post-transducción
g	Gramos
hr	Hora
i.v.	Intravenosa
i.a	Intra-amniótica
IgM	Inmunoglobulina M
kpb	Kilopares de bases
K₃Fe(CN)₆	Cianuro de hierro y potasio II
K₄Fe(CN)₆	Cianuro de hierro y potasio III
LTR	Repeticiones terminales largas (del inglés "Long terminal repeats")
MgCl	Cloruro de magnesio
M	Molaridad
ml	Millilitro
μl	Microlitro
min	Minuto
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros

Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en embriones de rata

Na_2HPO_4	Fosfato ácido de sodio
NaH_2PO_4	Fosfato diácido de sodio
No.	Número
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (del inglés "Phosphate-buffered saline")
PFU	Unidades formadoras de placa (del inglés "Plaque Forming Units")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés "Polimerase Chain Reaction")
pH	Concentración de hidrógeniones en solución
pl	Picolitro
p.v.	Partículas virales
p.v.t.	Partículas virales totales
RSV	Virus del sarcoma de Rous (del inglés "Rous sarcoma virus")
s	Segundos
v/v	Relación volumen/volumen
X	Número de magnificaciones al microscopio
X-gal	Reactivo de tinción para el revelado de los productos del gen β -galactosidasa