

## I. INTRODUCCIÓN

### I.I. Adenovirus.

#### I.I.I. Aspectos generales.

Los adenovirus se aislaron por primera vez en cultivos de células adenoides humanas por *Rowe y cols.* en 1953. A la fecha se han descubierto aproximadamente 100 serotipos y al menos 42 infectan al ser humano (familia Adenoviridae, adeno=glándula, *Enders y cols.*, 1956). Dada su capacidad oncogénica, los mastadenovirus (adenovirus de mamíferos) y los aviadenovirus (adenovirus de aves) producen tumores malignos cuando son inoculados en cobayos recién nacidos (*Tretin y cols.*, 1962). Gracias al enorme conocimiento alcanzado sobre el ciclo viral, los adenovirus han sido utilizados como potentes herramientas de estudio en la replicación de ADN, en la transcripción, el procesamiento del ARN y la síntesis de proteínas en células de mamíferos. Por estas mismas razones, también están siendo utilizados como vectores de expresión en tejidos de mamíferos (*Berget y cols.*, 1977; *Chow y cols.*, 1980).

El genoma adenoviral es fácil de manipular por técnicas de ADN recombinante. Este se replica de manera eficiente en células permisivas, no desarrolla rearrreglos de consideración y los genes foráneos insertados son mantenidos sin cambio a través de sucesivas rondas de replicación viral (*Challberg y cols.*, 1979).

#### I.I.II. Patogenia adenoviral.

Los adenovirus infectan las células epiteliales que revisten los órganos respiratorios e intestinales (viremia con diseminación visceral). El virus muestra una tendencia a permanecer latente en el tejido linfático, reactivándose por la inmunosupresión o la infección por otros agentes. (*Hogan y cols.*, 1942; *Jawetz y cols.*, 1959; *Wigand y cols.*, 1983).

Entre las enfermedades más comunes producidas por los adenovirus se encuentran las infecciones respiratorias (entre el 5-10 % de las enfermedades respiratorias pediátricas se atribuyen a los adenovirus; diseminadas por contacto respiratorio o fecal-oral), la conjuntivitis, la cistitis hemorrágica y la gastroenteritis caracterizadas por una latencia prolongada (*Wigand y cols.*, 1983).

### **I.I.III. Estructura y replicación.**

Los adenovirus son virus de tamaño intermedio, con un genoma de ADN bicatenario (36 kpb) (*Green y cols.*, 1967). Los viriones están constituidos por una cápsula icosaédrica de 70-90 nm y están compuestos exclusivamente por proteína y ADN. Sus proyecciones o fibras se originan a partir de los 12 vértices de la cápside proteica y que concluyen en botones. Estas dos últimas estructuras son indispensables para la interacción con los receptores celulares. La cápside se compone de 240 capsómeros formados por las proteínas hexónicas y pentónicas (*Horne y cols.*, 1959) (Figura 1).

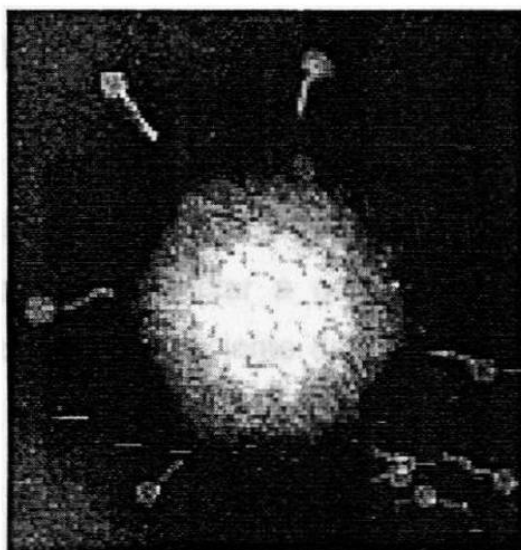


Figura 1. Microscopía electrónica de un adenovirus. Obsérvese la cápside ico-saédrica y algunas fibras, culminando en botones. Algunas fibras se han desprendido en la preparación.

El complejo central del virión contiene el ADN viral y al menos dos proteínas principales. Se conocen a la fecha 11 polipéptidos del virión del adenovirus con una función estructural bien identificada. (*Graham y cols.*, 1991).

La replicación de los adenovirus en cultivo se ha estudiado ampliamente (*Beltz y cols.*, 1979). Esta tiene una duración de 32-36 horas y produce 10,000 viriones o unidades formadoras de placa (PFU, siglas en inglés). Este ciclo viral consta de adhesión, penetración y liberación de la cubierta, así como de procesos genéticos tempranos y tardíos. (*Fenner y cols.*, 1974), según su ocurrencia antes o después de la replicación misma.

#### **I.I.IV. Vectores adenovirales de replicación deficiente.**

Los vectores adenovirales deficientes de replicación han sido utilizados por muchos años en experimentos que requieren un alto nivel de expresión de productos génicos y han sido vehículos efectivos para la administración de vacunas en sistemas experimentales. Sin embargo, no cabe duda que la aplicación más importante de estos vectores se ha producido en el campo de la terapia génica, siendo más utilizados en ensayos clínicos en este tipo de tratamiento experimental. Aunque la utilidad de los vectores adenovirales defectuosos de replicación ha excedido cualquier expectativa, sus limitaciones están también empezando a apreciarse.

Los adenovirus recombinantes con delección de la región E1 (AdE1) propagados en la línea celular derivada de riñón fetal humano 293 (HEK 293), pueden ser usados para transfectar a una población de células blanco, permitiendo una expresión muy eficiente del gen foráneo o transgen bajo el control de un promotor constitutivo.

En el caso de la terapia génica, los transgenes son preferiblemente insertados en el lugar donde se localizaba la región génica E1, aunque se pueden usar otros sitios del genoma adenoviral, tales como la región E3, cuyo producto está involucrado en la regulación negativa para la presentación celular del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y en la evasión de la vigilancia inmune *in-vivo* (*Latchman y cols.*, 1994).

La capacidad total de empacamiento de los vectores adenovirales es de 105% del tamaño del genoma (*Graham FL y col.1995*). Por esta razón, los vectores AdE1<sup>-</sup> tan sólo pueden albergar transgenes de 1.5 kpb y los que tienen una-delección adicional de E3 pueden permitir acomodar insertos de hasta 7.5 kpb. Los vectores recombinantes adenovirales son capaces de promover la expresión transgénica en células quiescentes, e incluso, en células terminalmente diferenciadas.

Los vectores adenovirales recombinantes pueden llegar a expresar un transgen en la totalidad de las células *in vitro* (*Simon y col, 1993*). Los vectores AdE1<sup>-</sup> intrínsecamente proveen sólo expresión transitoria. En ensayos *in-vivo* se ha detectado expresión *in vivo* de vectores AdE1<sup>-</sup> por más de 6 meses en neuronas (*Neve y cols., 1993*) y en células musculares (*Vincent y cols., 1993*). Sin embargo, en otros sistemas la expresión transgénica ha sido menos prolongada como en células endoteliales respiratorias, arterias y venas, linfocitos, macrófagos, hepatocitos, neuronas, células gliales y astrocitos (*Simon y col, 1993 y Wilkinson y cols., 1994*). Es importante mencionar que la expresión génica de los vectores adenovirales basados en los serotipos 2 y 5 humanos (miembros del grupo C) no está restringida a nuestra especie y que puede analizarse en otras especies de mamíferos como roedores, cerdo, perro, etc., sin embargo, aun no es posible replicar el genoma viral en células no permisivas, incluyendo a las de otras especies diferentes de la humana (*Rojas-Martínez y cols., 1998*).

#### **I.I.V. Transferencia génica prenatal.**

A mediados de 1998 se dió inicio a la revisión de protocolos de transferencia génica prenatal (*Liebert, 2000*), tratando de establecer las regulaciones principales que deben regir la terapia génica *in útero*.

Como consecuencia, estas regulaciones implican que la transferencia génica debe poseer un carácter potencialmente benéfico para la prevención o

tratamiento de enfermedades asociadas a riesgos de morbilidad/mortalidad altos y/o de carácter letal para el feto o futuro producto (fibrosis quística, hemofilia A, distrofia muscular, etc.). Adicionalmente, esta terapia sólo contemplará la transducción de células somáticas y nunca se realizará en productos que se espere que se desarrollen normalmente.

Muchas enfermedades congénitas severas son candidatas para terapia génica prenatal, debido a la carencia de un tratamiento postnatal efectivo. Aunque lo anterior tiene un enorme potencial, se reconoce de manera simultánea que existe una carencia de conocimientos preclínicos y de más estudios en modelos animales para la transferencia génica *in útero*, principalmente para vectores adenovirales. Las técnicas utilizadas deben asegurar un alto grado de transducción y de expresión en tipos celulares y tejidos fetales específicos, con la identificación de marcadores que permitan el rastreo de una posible respuesta inmunológica, lo cual abriría una ventana de oportunidades para una transferencia exitosa; es decir, una transferencia antes que el feto pueda reconocer inmunológicamente lo propio de lo extraño.

A todo lo anterior, se aúna el monitoreo del progreso de la gestación o el desajuste posterior en el desarrollo postnatal; además de procesos de mutagénesis insercional y sobre todo de posibles efectos patológicos y toxicológicos generados por la administración del vector. Sobre estos últimos procesos toxicológicos existe una gran preocupación, pues el riesgo de exponer al producto gestacional a una administración del vector en el líquido amniótico o en la cavidad peritoneal es muy grande y las consecuencias son aún desconocidas, principalmente en el campo de la teratogénesis.

## II. ANTECEDENTES

Los importantes desarrollos logrados en el campo de la terapia génica desde la introducción de los vectores recombinantes adenovirales, han permitido sostener la idea que la terapia génica *in vivo* es un proceso factible. Sin embargo, la utilidad de estos vectores adenovirales en adultos es aún limitada, debido a las respuestas inmunes, tanto celular como humoral, que se desencadenan contra el vector, el producto del transgen, y por supuesto contra las células transducidas; las cuales ya fueron responsables de un descenso en un ensayo clínico (Thompson, 2000). La terapia intrauterina ofrece la posibilidad de una transducción vectorial con una respuesta inmune atenuada si se realiza antes de la maduración del sistema inmunológico (Zepeda y cols., 1996).

Desde los años setentas se han realizado diversos estudios sobre las consecuencias de la exposición de embriones o fetos a diferentes tipos de agentes virales. Se ha descartado que los embriones puedan ser dañados por agentes toxicológicos en etapas previas a la implantación, incluyendo las etapas de blastocisto y anclaje, debido a la pluripotencialidad de las células embrionarias (Baker y cols., 1980). Aunque los tipos de adenovirus utilizados para la construcción de vectores adenovirales están asociados con infecciones asintomáticas o benignas (infecciones del tracto respiratorio, queratoconjuntivitis y gastroenteritis), estos agentes también pueden ser causantes de bronconeumonía en infantes, y en raras ocasiones, de infección sistémica en individuos inmunocomprometidos. Este tipo de vectores también puede tener riesgos adicionales los embriones o fetos que aún han sido estudiados. Por estas razones existe cierta preocupación sobre la toxicidad potencial asociada al uso de vectores adenovirales recombinantes en embriones o fetos, especialmente cuando se intenten tratamientos múltiples para mantener un efecto terapéutico. Para aclarar más este punto, se hará una breve exposición de las observaciones realizadas sobre la infección viral intrauterina.

## **II.I. Infecciones virales.**

A mediados del siglo pasado empezaron a conocerse los efectos toxicológicos de una gran variedad de virus en las etapas prenatales de nuestra especie, estableciéndose de manera precisa las consecuencias de tal exposición. Entre éstos se pueden citar los incluidos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Agentes virales implicados en patología embrionaria y fetal humana.**

<b>Agente infeccioso</b>	<b>Efectos Toxicológicos</b>
Virus de la rubéola	Cardiopatías, microcefalia, cataratas, sordera y deficiencia mental
Citomegalovirus	Microcefalia y deficiencia mental
Varicela	Hipoplasia de miembros, microftalmía y deficiencia mental
Herpesvirus	Cáncer
Virus Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt

Las investigaciones realizadas a finales del mismo siglo en ovejas expuestas a bunyavirus en etapas gestacionales tempranas, probaron tener un efecto similar a las infecciones en nuestra especie y evidenciaron que producían malformaciones similares a las observadas en infantes humanos (*Edwards y cols. 1997*). Los principales hallazgos se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2. Efectos teratogénicos producidos por bunyavirus en ovejas.**

<b>Serogrupo</b>	<b>Efectos toxicológicos</b>
La Crosse, San Angelo y Main Drain	Artrogriposis, hidrocefalia, muerte fetal, desviaciones esqueléticas axiales, anasarca y oligohidramnios ( <i>Edwards y col. 1997</i> ).
Akabane y Valle Cache	Malformaciones músculo-esqueléticas y cerebrales ( <i>Parsonson y cols, 1977</i> ).

Las ovejas infectadas en los días 30 a 36 del embarazo produjeron corderos deformes, los cuales poseían anticuerpos neutralizantes contra el virus Akabane y presentaban malformaciones como artrogriposis, hidrocefalia, xifosis, escoliosis, microcefalia, decremento marcado en el número de neuronas del cuerno ventral y depleción de mielina, atrofia severa de músculo esquelético y reducción del número de timocitos en la corteza. Los efectos del virus estaban relacionados con la edad gestacional en la cual el feto fue expuesto al virus (*Parsonson y cols, 1977*).

También existen otros virus, como los parvovirus de cadena sencilla, que pueden infectar humanos y otras especies animales. Las infecciones pueden ser citolíticas en grupos celulares selectos y pueden producir defectos específicos del desarrollo o desencadenar efectos más generalizados como anemia, pancitopenia, hemorragia, e incluso pueden producir la muerte fetal (Jordan y cols. 1994).

Al finalizar el siglo XX se comienzan a describir los efectos tóxicos gestacionales de los adenovirus en nuestra especie. En 1995 se documentó por primera vez un caso de neumonía adenoviral fatal en un producto humano de 25 semanas de gestación por microscopía electrónica e hibridación *in-situ* (Montone y cols., 1995). En 1998 se hizo lo propio con un caso de *hydrops fetalis* y taquiarritmia en un feto de 27 semanas, en el que se detectó adenovirus por PCR (Ranucci-Weiss y cols., 1998).

## **II.II. Transducciones virales para terapia génica intrauterina.**

Con la finalidad de establecer tratamientos prenatales para enfermedades hereditarias y letales de alta incidencia, se han realizado estudios preclínicos de terapia génica en diferentes estadios gestacionales, empleando diversos modelos animales. En algunos de estos ensayos se utilizan vectores adenovirales, para registrar patrones específicos de transducción tisular y determinar su eficacia y duración. Diversos estudios demuestran una reacción marcada de anticuerpos neutralizantes contra el vector y el producto proteico codificado por el transgen (Tabla 3).



Tabla 3. Estudios preclínicos de terapia génica gestacional.

Grupo	Vector viral (transgén)	Vía de administración	Efecto de la transducción
Vincent y cols.	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	intratraqueal (ovejas)	Infiltrados celulares en pulmón (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) respuesta inflamatoria considerable a (14 d.p.t.)
McCray y cols.	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Líquido amniótico	Intensa expresión en epidermis fetal y membranas amnióticas, poca expresión gastrointestinal y epitelio de vías aéreas. Hiperplasia reactiva y metaplasia escamosa en epitelio traqueal. Infiltrados celulares inflamatorios en el tejido pulmonar con CD4, CD8, IgM y células efectoras a granulocitos/macrófagos, y presencia de anticuerpos antivirales (7 d.p.t.).
Pitt y cols.	Retrovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Vías aéreas	Expresión en epitelio y espacio submucoso de vías proximales y epitelio respiratorio de vías distales.
Tsukui y cols.	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Estado pronuclear (huevos libres de zona pelúcida)	Sin cambios morfológicos o efectos citotóxicos aparentes a estadios de mórula y blastocistos.
Holzinger y cols.	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Intra-amniótica	Membrana amniótica. Menores niveles en aparatos digestivo y respiratorio; engrosamiento intersticial difuso, neutrófilos intraluminales en las vías aéreas distales, agregados de macrófagos intersticiales y linfocitos en tejido pulmonar.

También se ha explorado la posibilidad de la transferencia génica con vectores adenovirales en placenta humana, transduciendo células de citotrofoblasto. El vector transdujo eficientemente las células mononucleares del citotrofoblasto, pero las células mostraron una marcada reducción en la eficiencia de transducción después de la diferenciación terminal a trofoblastos sincitiales multinucleados (*MacCalman y cols.*, 1996). Este resultado puede implicar limitaciones en la utilidad de la terapia génica realizada en este tejido y en los niveles de transducción fetal. Así mismo, se ha establecido que la transducción de células trofoblásticas por vectores basados en virus herpes simplex y virus adenoasociados se ve afectada por la diferenciación celular, lo cual puede tener las mismas repercusiones mencionadas para los vectores adenovirales (*Parry y cols.*, 1998).

En 1997, *Cheng y cols.* definieron los niveles de transducción con un vector adenoviral E1<sup>-</sup> comparando líneas celulares generadas a partir de diferentes espacios del intestino de rata con la transducción intestinal *in-vivo* en ratas Sprague Dawley. Ellos encontraron que las líneas celulares poseen más altos índices de transducción que los modelos *in vivo*. Estos estudios también determinaron que la distribución de la transducción era positiva en duodeno, yeyuno, ileon y algunas partes del colon. La transducción aumentó después de la administración de dosis secundarias, encontrándose picos en los días 3 y 4, y que decreció entre los días 7 y 14. Estos autores no encontraron anticuerpos en suero después de las transducciones (*Cheng y cols.*, 1997).

Para evaluar la factibilidad de usar la terapia génica *in vivo* durante los estadios iniciales de la organogénesis de modelos en mamíferos, se realizaron varios ensayos empleando diversas especies, diferentes tipos de vectores y en diferentes etapas del desarrollo gestacional. Como se muestra en la Tabla 4, en la mayoría de los experimentos no se encontraron afecciones notorias en la morfología externa de los fetos transducidos; sin embargo las variaciones en las dosis de los vectores provocaron malformaciones severas en algunos estudios. Los patrones de traducción fetal con vectores adenovirales administrados en la placenta o por vía sistémica a la madre durante el desarrollo intrauterino, se muestran en la Tabla 5. Estos experimentos reportan patrones de transducción extensa y en algunos casos, muestran efectos tóxicos en la madre.

Alternativamente, algunos investigadores han ensayado la administración directa al órgano blanco fetal, utilizando endoscopía, inyección directa en órgano blanco, o inyección guiada con ultrasonido, con la finalidad de establecer patrones transduccionales más limitados (Tabla 6).

Tabla 4. Efectos de la transducción viral en modelos animales en etapas gestacionales tempranas.

Investigador	Vector viral (transgen)	Transducción (d.p.c.) vía de administración	Efectos de la transducción
<i>Kubisch y cols. (1997)</i>	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Intra-amniótica ( $2.5 \times 10^5$ pfu/100 $\mu$ l)	6% de las ratas en cultivo llegan al estado de blastocisto vs 62% de controles. Retardo en el crecimiento in vivo (Observado previamente por Neighbour PA, 1978).
<i>Baldwin y cols. (1997)</i>	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Embriones postgas-trulación. Evaluación: 36-48 hrs post-transducción.	Efectos adversos no detectables en el desarrollo normal durante la morfogénesis temprana. Patrones de transducción dependientes de promotor (CMV, RSV y LTR).
<i>Harting y cols. (1998)</i>	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Neurulación activa	$6 \times 10^8$ partículas/ $\mu$ l: Malformaciones severas. $1.5 \times 10^8$ partículas/ $\mu$ l: No se observan malformaciones.

Tabla 5. Distribución de la expresión en ensayos preclínicos de terapia génica intrauterina con vectores adenovirales.

Investigador	Viral Vector (Transgen)	Vía de administración	Efectos de la transducción
<i>Turkey y cols. (1999)</i>	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Microinyección intraplacentaria	Corazón e hígado (9.5 y 11.5 d.p.c.). Menor transducción en sistema vascular y cerebro posterior. Expresión del transgene hasta dos meses posteriores al nacimiento (baja frecuencia).
<i>Lipshutz y cols. (1999)</i>	Adenovirus (Luciferasa)	Inyección intraperitoneal, intrahepática, e intramuscular (15 d.p.c.). $1 \times 10^8$ y $1 \times 10^{10}$ p.v.l.	Alta expresión en cerebro, intestino, hígado y pulmón, persistencia de expresión de 32 días. Intramuscular: estroma de la médula espinal, hígado, pulmón y ganglio de la raíz dorsal. No hay señales de inflamación. Elevación considerable de transaminasas hepáticas en la madre, pero sin alteración en el feto.

**Tabla 6. Transducción viral en modelos *in-vivo* de administración viral en órgano blanco.**

<b>Investigador</b>	<b>Viral Vector Transgen</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Efectos de la transducción</b>
Yang y cols. (1999)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Fetoscopia intratraqueal	Eficiente transducción en alvéolos a los 14 d.p.c., con evidencia de respuesta inmune. La transducción temprana produce alta expresión en hígado, glándulas adrenales, riñones y endocardio, sin la producción de anticuerpos neutralizantes.
Wood y cols. (1999)	Adenovirus (Luciferasa)	Inyección órgano-específica.	Expresión del vector en órgano blanco y zonas aledañas. Transducción sistémica (hígado), con una dispersión homogénea en los órganos analizados.

Varios investigadores han analizado los efectos tóxicos y la respuesta inmunológica en el feto después de la transducción con vectores adenovirales (Tabla 7). Con respecto a la toxicidad de los vectores adenovirales, la proteína pentona (componente de la cápside), puede ser citotóxica a una concentración elevada. Las altas dosis de transducción también pueden producir replications virales limitadas. Adicionalmente, ciertos tipos celulares poseen una actividad endógena tipo E1, la cual pudiese potencialmente permitir que ocurriera una replicación limitada del virus (*Engelhardt y cols., 1993*). El estudio más detallado que ha sido publicado, basado en una transferencia génica mediada por vectores adenovirales a mandriles, ha demostrado que altas dosis del agente pueden inducir respuesta inflamatoria en el pulmón, probablemente inducida por las proteínas adenovirales en el inóculo (*Bunnell y cols., 2000*).

Tabla 7. Efectos tóxicos e inmunológicos de la transducción intrauterina.

Investigador	Vector viral (transgen)	Vía de administración	Efectos tóxicos
Iwamoto y cols. (1999)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Inyección intraute-rina	Más del 10% de los fetos muere <i>in utero</i> . La muerte no está asociada al proceso quirúrgico o agentes anestésicos. Considerable respuesta inflamatoria. La exposición repetida está asociada a mortalidad y patologías considerables.
Jerabtsova y cols. (2000)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Inyecciones intramusculares, intrahe-pática y retroorbitales (directa). Intra-amniótica e intraplacentaria (no di-recta). Dosis límite $1 \times 10^{10}$	No directa: Poca expresión en órganos internos del feto, sólo piel y tubo digestivo. Poca expresión en hígado. Directa: Expresión en el área de transducción. Relación li-neal dosis:muerte fetal.
Gaensler y cols. (2000)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Estados gestacionales específicos con inyecciones posteriores en edad madura.	No desarrollo de inmunidad al vector y niveles de expresión similares a los nativos en inyecciones tardías.
Larson y cols. (2000)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Estados gestacionales específicos en <i>Macaca mulatta</i>	Actividad visible a los 30 d.p.t. Transducción en pulmones e intestino, sin efectos adversos en la madre. Liberación de producto transgénico del pulmón a la circulación, túbulos proximales y vejiga. PCR negativo en tejidos que no poseen contacto con líquido amniótico.
Lipshutz y cols. (2000)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Inyección intrahepática (15d.p.c.) y consecuentes inyecciones post nacimiento	No producción de respuesta inmune humoral al vector o producto transgénico. Desarrollo de anticuerpos al adenovirus en grupos experimentales y controles.
Masato y cols. (2000)	Adenovirus ( $\beta$ -galactosidasa)	Inyección intra-amniótica, placentaria y espacio intraperitoneal	Niveles de transducción baja en ratones y alta en cobayos, detectándose expresión principalmente en hígado, corazón, bazo y glándula adrenal. Niveles más bajos en riñón, intestino y placenta.

### **II.III. La rata como modelo experimental para terapia génica intrauterina.**

A la fecha, el modelo animal preclínico preferencialmente utilizado para las intervenciones intrauterinas es el ratón (*Mus musculus*) y los experimentos realizados incluyen manipulaciones *ex vivo* de células pluripotenciales y transducciones específicas a órganos blanco previamente determinados. El modelo, sin embargo posee la limitante concerniente al tamaño del animal y de sus embriones (dificultad en la manipulación del producto).

La rata ofrece muchas ventajas para los estudios toxicológicos intrauterinos. Posee un ciclo reproductivo corto, un alto grado de fecundidad con un alto número de crías, un rango bajo de malformaciones espontáneas y fetos convenientemente grandes y fáciles de manipular, encontrándose que las ratas con un peso de 200-225 g son las más adecuadas para este tipo de protocolos preclínicos. Tiene un periodo embrionario proporcionalmente grande, que abarca hasta el día 19 días post-coito (d.p.c., gestación 20-21 días). Adicionalmente, este animal es relativamente resistente a enfermedades y tolera bien los procedimientos quirúrgicos de gran magnitud (*Bragg y cols., 1922; Job y cols., 1935*). Los reportes de transducciones adenovirales en rata (*Rattus norvegicus*) son escasos y no existen protocolos diseñados para este modelo animal donde se estudien los efectos de la transducción, tanto en el producto como en la madre, después de la administración endovenosa sistémica e intra-amniótica en períodos gestacionales específicos. Tampoco se sabe mucho sobre los efectos toxicológicos asociados a esta transducción.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

En este trabajo se propuso estudiar los efectos tóxicos de los vectores adenovirales durante la embriogénesis, después de la transducción sistémica endovenosa o intraamniótica en ratas preñadas. Se planteó estudiar los efectos toxicológicos que estarían relacionados con las actividades biológicas de los vectores adenovirales, con la expresión del gen terapéutico y/o marcador, y con los efectos debidos a la respuesta inflamatoria dentro del ambiente intrauterino. Así mismo, se intentó establecer un patrón de transducción específico para los estadios pre-establecidos de 12 y 15 d.p.c., para determinar posibles asociaciones entre tejido transducido y daño toxicológico, tanto en el producto, como en la madre.

Se espera que el conocimiento generado en este trabajo contribuya a aportar datos sobre la seguridad de las aplicaciones de la terapia génica *in-utero* y a la prevención de defectos en productos y madres que recibieran tratamientos con estos vectores durante los períodos tempranos del embarazo.

#### **IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Este estudio fue desarrollado mediante la implementación de varias técnicas que permitieron establecer criterios específicos para estudiar la asociación entre transducción con vector adenoviral *in vivo* y efecto toxicológico en los productos. La Figura 2 ilustra los pasos de la estrategia de este estudio.

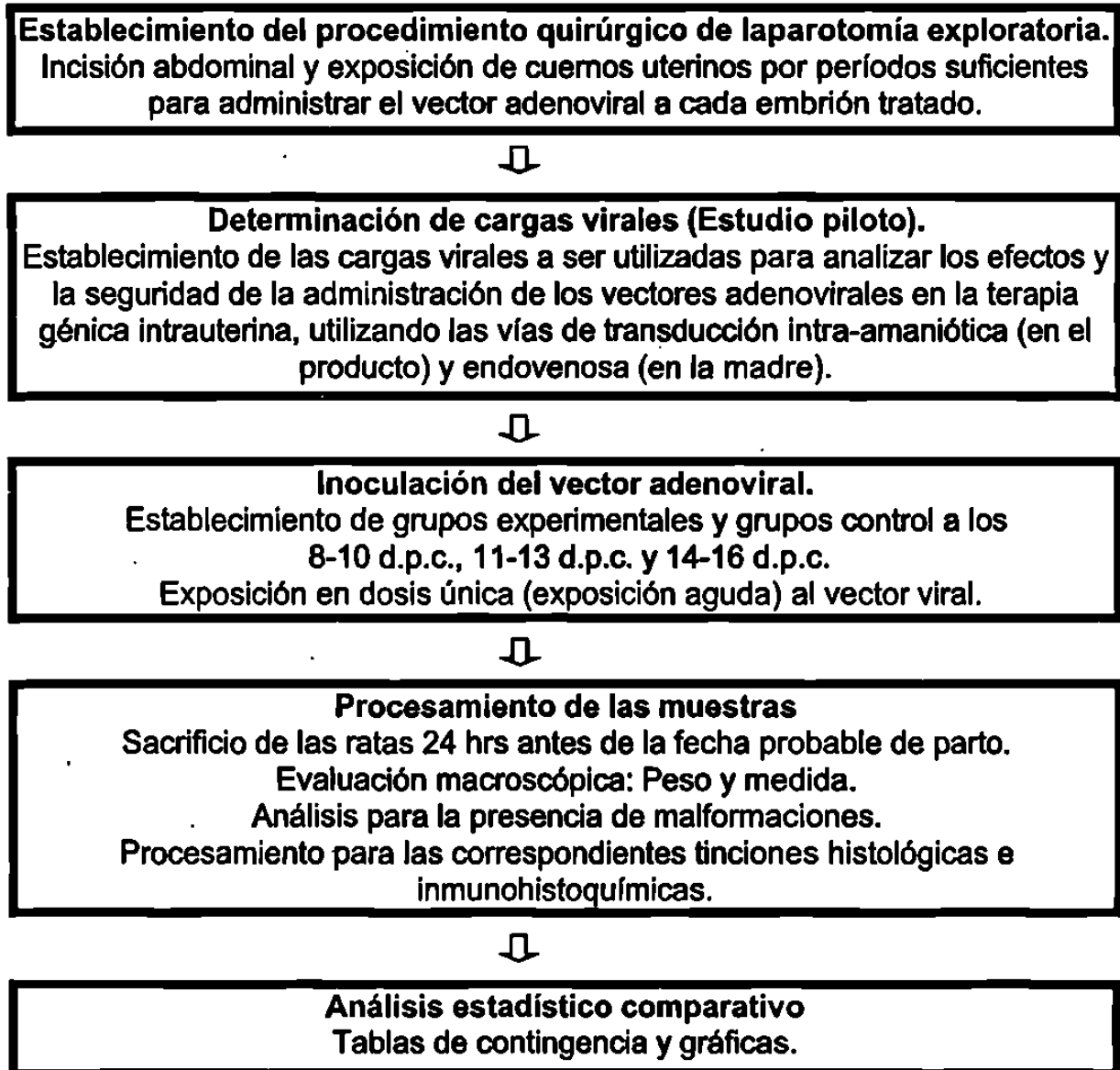


Figura 2. Estrategia general. Resumen de las etapas que constituyeron el estudio.



Inicialmente se estandarizó el proceso quirúrgico de laparotomía exploratoria para la transducción intra-amniótica. Este proceso quirúrgico invasivo, permitió determinar las consecuencias de las intervenciones intra-amnióticas en diferentes estadios gestacionales para el producto y la madre, así como la naturaleza y frecuencia de los efectos adversos. Este procedimiento está basado en la realización de una incisión de la pared abdominal y la exposición de cuernos uterinos por períodos suficientes para administrar el vector adenoviral a cada embrión tratado.

Una vez confirmada la viabilidad del método, fueron establecidas las dosis virales a ser utilizadas para analizar los efectos y la seguridad de la administración de los vectores adenovirales en la terapia génica intrauterina, utilizando las vías de transducción intra-amniótica (en el feto) y endovenosa (en la madre). Dichas dosis estuvieron basadas tanto en los criterios de dosis letal media para la madre, como la obtención del mayor número de malformaciones y efectos toxicológicos con la menor cantidad de vector administrado en una dosis única por las vías endovenosa e intra-amniótica (exposición aguda).

Se inició con un estudio piloto en el que se analizaron los efectos tóxicos de la transducción en tres grupos de edad gestacional: 8-10 d.p.c., 11-13 d.p.c. y 14-16 d.p.c. Estos estadios estuvieron sujetos a cambios o modificaciones dependiendo de los resultados obtenidos y de la obtención de productos viables al momento del sacrificio de las madres. Los resultados de este estudio piloto generaron las condiciones del trabajo para analizar los efectos tóxicos en estadios gestacionales precisos en cada grupo experimental y su correspondiente control.

Debido a las posibles malformaciones presentes en los productos obtenidos en los grupos experimentales, las ratas fueron sacrificadas 24 hrs antes de la fecha probable de parto, para evitar que la madre devorara los productos malformados o muertos. Los fetos recuperados en las madres

tratadas fueron pesados y medidos antes de la disección y el procesamiento para las correspondientes tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. Un análisis histológico de secciones y tejidos particulares determinó la presencia del vector adenoviral en los tejidos maternos y fetales. Los resultados obtenidos se consignaron en tablas de contingencia, las cuales fueron empleadas para estudios estadísticos y generación de gráficas.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.I. Origen de los reactivos.

Harlan-México, S.A. de C. V.

Ratas Sprague Dawley (peso aproximado de 200-250g.)

<https://www1.fishersci.com>

Suero fisiológico	NaCl 0.9%
Alcohol etílico	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
Eter dietílico	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Hematoxilina de Harris	
Ácido clorhídrico	HCl
Hidróxido de amonio	NH <sub>4</sub> OH
Xileno absoluto	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> )
Fosfato dibásico de sodio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Fosfato monobásico de potasio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Cloruro de sodio	NaCl
Cloruro de potasio	KCl
Formaldehído	HCHO
Sulfato de aluminio	Al <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
Cianuro férrico de potasio	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
Cianuro ferroso de potasio	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
Doxicolato de sodio	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub>
NP-40	

<http://www.sigmaaldrich.com/>

OG-6  
EA-50  
Bálsamo de Canadá  
Rojo rápido nuclear.  
Peroxidasa endógena  
Anticuerpo primario Ad5-antiratón  
Anticuerpo secundario conejo-antiratón IgG.

<http://www.wyeth-pharmaceutical.com>

Ketamina (Ketaset)  
Xilacina (Rompun)

<http://www.hamiltoncomp.com>

Jeringa Hamilton N-701 (Cemented Needle)

<http://www.shandon.com/>

Thermo Shandon Citadel 1000  
Shandon Histocentre 2

Criostato Microm (HM 505N)  
Labline Hot Plate

## V.II. MÉTODOS.

### V. II.I. Citología vaginal exfoliativa.

Las muestras vaginales fueron obtenidas de ratas jóvenes adultas cepa Sprague Dawley con un peso aproximado entre 200-250gs. Estas fueron colocadas en posición decúbito ventral como se muestra en la Figura 3. Se utilizó suero fisiológico (NaCl 0.9%) como vehículo para hacer los lavados vaginales.

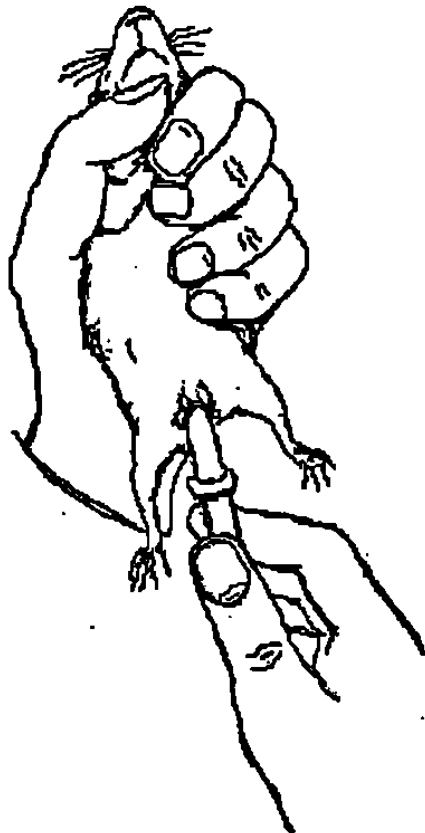


Figura 3. Técnica de citología vaginal exfoliativa. Esta técnica es la más rápida para la determinación del embarazo con un mínimo de manipulación y con casi un 100% de confiabilidad en el diagnóstico.

El material obtenido fue colocado en un portaobjetos y secado a la flama suave del mechero.

#### **V. II.II. Tinción de Papanicolaou.**

El proceso de fijación del lavado vaginal fue realizado con una mezcla de alcohol:éter relación 1:1, v/v, por espacio de 15 a 20 min. Posteriormente, las laminillas fueron sumergidas en alcohol etílico al 96%, 80% y 70%. Se realizaron baños sucesivos en agua corriente y se procedió a teñir con hematoxilina de Harris por 5 min.

Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados y sumergidos en ácido clorhídrico al 0.5% e inmediatamente después, estos fueron sumergidos en agua y mantenidos en hidróxido de amonio al 0.5% por 30 s. A continuación se realizó una deshidratación progresiva con etanol al 70%, 80% y 96%. Finalmente, el material se tiñó con un segundo colorante (OG-6) por 4 min. Un paso intermedio en alcohol al 96%, dió pie al colorante citoplasmático final EA-50 por 3 min. La deshidratación y el montaje final de las laminillas incluyeron baños en alcohol al 96%, 100%, xileno por 5 min cubreobjetos y resina bálsamo de Canadá.

Las muestras fueron observadas mediante microscopía de luz identificando las fases del ciclo estral. (Refiérase al Apéndice B). Una vez que fue detectado el estadio de pro-estro, las ratas fueron apareadas con machos jóvenes adultos de la misma cepa con un peso aproximado de 350g. A la mañana siguiente del apareamiento, se realizaron citologías vaginales exfoliativas para detectar espermatozoides. La presencia de éstos determinó el día 0 post-coito (d.p.c.).

#### **V.II.III. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral.**

El ciclo estral de la rata fue determinado con la finalidad de conocer la morfología y los cambios histológicos en las células vaginales, que nos permitieran determinar el tiempo en el cual la rata era fértil. Este período de

fertilidad, que son aproximadamente 12 horas, nos permitiría aparear a las ratas y establecer el estadio gestacional de manera confiable.

Debido a lo anterior, cinco hembras fueron separadas del resto de las ratas disponibles para el estudio y a éstas les fueron tomadas mediante gotero las muestras vaginales, bajo las especificaciones mencionadas en materiales y métodos, lográndose establecer un ciclo estral completo (Figura 4).

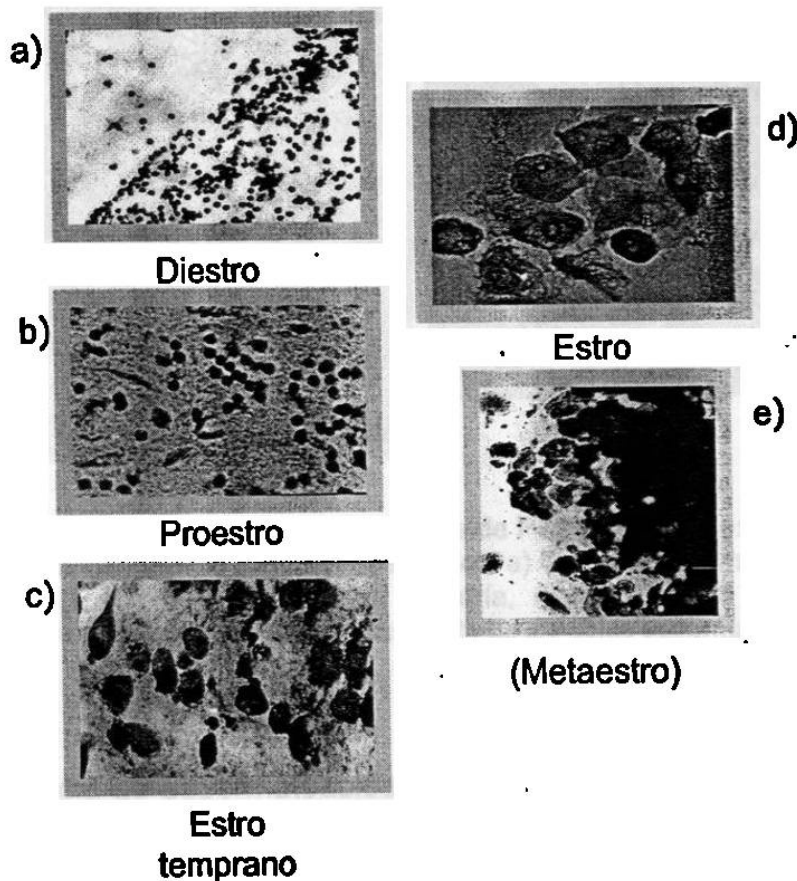


Figura 4. Ciclo estral de la rata. Tinción de Papanicolaou, visualizada por microscopía de luz. a) Diestro. Abundantes linfocitos y células de la capa basal (10X). b) Proestro. Células epiteliales con citoplasma basófilo (20X). c) y d) Aumento de células cornificadas (40X). e) Metaestro. Desaparecen células cornificadas y aumentan leucocitos para dar inicio a un nuevo ciclo (40X).

Una vez identificadas las células características de cada ciclo (refiérase al apéndice B de este trabajo), se procedió a aparear las hembras en grupos de 10 ratas hembras con dos machos fértiles. Cinco ratas en el estadio de proestro

fueron colocadas en una caja con dos machos fértiles por espacio de toda una noche. A la mañana siguiente, los machos fueron sacados de las cajas y las hembras examinadas para la presencia de espermatozoides en la vagina. Se realizó una citología vaginal que fue teñida con la técnica de Papanicolaou (Figura 5).

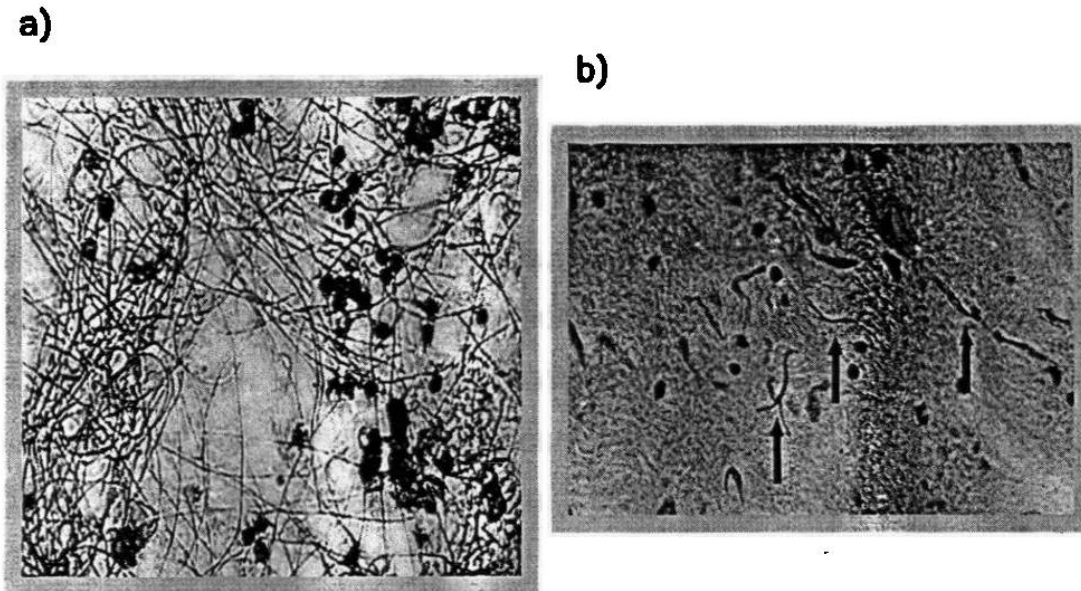


Figura 5. Frotis vaginales teñidos por la técnica de Papanicolaou. Los frotis muestran la degradación encontrada del material espermático. a) Cabezas y colas espermáticas con una morfología completa en su gran mayoría, después de la cópula (40X). b) Remanentes de cabezas y degradación completa de las colas espermáticas (60X).

La presencia de espermatozoides en el estudio determinó el día 0 d.p.c. Las ratas gestantes fueron colocadas en cajas separadas del resto de las ratas no gestantes y conservadas en un lugar distante hasta que les fue practicada la transducción adenoviral.

#### **V. II.VI. Trasducción adenoviral.**

La transducción fue realizada utilizando el vector adenoviral AdV-CMV- $\beta$ gal, un vector adenoviral tipo 5 con delección de los genes E1 a, E1b y E3; que contiene el gen reportero *lacZ* de *Escherichia coli* bajo el control del promotor constitutivo temprano del citomagalovirus humano (HCMV).

Este vector fue donado por el Dr. Estuardo Aguilar Córdova (Laboratorio de Vectores de Terapia Génica del Centro para Terapia Génica y Celular del Colegio Baylor de Medicina, en Houston, Texas). El vector preparado a una concentración de  $1 \times 10^{12}$  pv/ml, fue administrado a dos grupos de ratas: 20 ratas en el grupo de transducción intravenosa (i.v.) y 10 más en el grupo de transducción intra-amniótica (i.a.). Cada grupo se subdividió en dos subgrupos de edad gestacional para explorar los efectos de la transducciones a los 12 y 15 d.p.c. Los detalles de los procedimientos realizados en las dos rutas mencionadas se explican a continuación.

#### **V. II.V. Transducción Intravenosa.**

Para este grupo, se utilizaron cinco ratas para ser transducidas con el vector AdV-CMV- $\beta$ gal y otras cinco sirvieron como control en cada estadio gestacional. La transducción se realizó con una carga viral de  $1 \times 10^{11}$  pv y las ratas control fueron inyectadas con suero fisiológico (NaCl 0.9%) con una aguja calibre 29 X 13 mm.

Posterior a la transducción, las ratas fueron conservadas en sus jaulas hasta el día 19 d.p.c., fecha en la cual fueron sacrificadas por dislocación cervical bajo previa sedación con éter. Una vez sujetadas de sus cuatro extremidades a la tabla de cirugía, se incidió en la línea blanca abdominal con la finalidad de exponer los cuernos uterinos para contar y recuperar los fetos así como para determinar la presencia de glándulas metriales. Posteriormente los fetos fueron liberados del cuerno uterino y de su saco amniótico; medidos, pesados y analizados macroscópicamente para determinar la presencia de posibles malformaciones. En lo que respecta a la madre se disecaron: cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones y ovarios. Cada órgano fue analizado macroscópicamente para explorar la presencia de procesos patológicos.



#### **V. II.VI. Transducción intra-amniótica.**

Este grupo fue sometido al proceso quirúrgico laparatomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos. Las ratas fueron anestesiadas con una solución de Ketamina (Ketaset, 100 mg/ml) y xilacina (Rompun, 20 mg/ml), 2:1, v/v, a 1 µl/g de peso.

Las ratas fueron sujetadas, se realizó asepsia, tricotomía del área abdominal y la posterior antisepsia del área de trabajo. La incisión se realizó en el ámbito de la línea blanca, disecándose piel y músculo. Posteriormente, se localizaron los cuernos uterinos, los cuales fueron expuestos y acomodados para el conteo de embriones en cada uno. La inyección intra amniótica con rector o solución salina se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Algunos sacos amnióticos del cuerno uterino izquierdo fueron transducidos con vector adenoviral, mientras que los del cuerno derecho fueron inoculados con suero fisiológico, sirviendo estos últimos como control del estudio. Se realizó la punción del cuerno uterino y saco amniótico con una jeringa Hamilton (N701), sin puncionar el feto, administrándose una carga viral de  $1 \times 10^{10}$  pv. Finalmente se reintrodujeron los órganos expuestos y se realizó el cierre de cavidad utilizando seda quirúrgica 000. Se hizo el monitoreo de la herida quirúrgica diariamente (Figuras 6 y 7).

Las ratas fueron sacrificadas a los 19 d.p.c. por dislocación cervical, previa sedación con éter. La recuperación de los fetos se realizó de la misma manera que en la transducción i.v.

#### **V.II.VII. Análisis anatomopatológico.**

El material biológico extraído (fetos, cuernos uterinos y órganos de la madre), fue conservado en formol al 10% en buffer de fosfatos 0.9% solución salina (KCl 3.75 mM, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH=7.4) por espacio de 24 horas. Posteriormente se hizo un lavado con formol al 10%, para finalmente ser añadido alcohol al 70% por espacio de 3 días. El

procesamiento de los fetos se llevó a cabo disecándolos sagitalmente procediendo de la misma forma con su placenta. Los órganos de la madre por su parte, fueron disecados sagital y coronalmente.

El proceso de inclusión en parafina, se llevó a cabo por encapsulación en histosette I manteniéndose en formol por 24 horas. Posteriormente valiéndose del aparato ThermoShandon Citadel 1000, las muestras fueron incluidas en parafina en un lapso de 19 horas, pasando en este tiempo por formol, alcohol al 70%, 80%, 96%, xileno y finalmente dos baños de parafina. Los bloques de parafina sólida fueron realizados en el aparato Shandon histocentre 2. De cada muestra incluida se realizaron 2 cortes de un grosor de 6 micrómetros con criostato (Microm HM505N) se extendieron en un baño de flotación de tejido Lab-line a 40°C, para posteriormente ser montados en portaobjetos de 25X75 mm. Los dos cortes obedecen a la comparación entre daño y/o malformación asociada a la presencia del vector adenoviral, por medio de tres tinciones: Hematoxilina y eosina, X-gal y rojo rápido nuclear.

#### **V.II.VII.I. Tinción con hematoxilina y eosina.**

Una vez montados los cortes en portaobjetos fueron colocados en una fuente de calor para liberar el tejido de la parafina (Hot Plate, Lab-Line) y sumergidos en Xileno por espacio de 10 min. Subsecuentemente por períodos de 3 min, se hidrataron con etanol al 100%, 96% y 80%, para finalmente realizar 10 inmersiones en agua corriente, y ser teñidos en hematoxilina de 4-8 min.

Un paso intermedio en agua corriente fue seguido de ácido clorhídrico al 0.5% e hidróxido de amonio al 0.5%, para enseguida sumergirse en agua corriente nuevamente. El paso por el colorante eosina duró 30 a 45 s. Los cortes se deshidrataron con etanol en pasos sucesivos de 80%, 96% y 100% para finalmente ser mantenidos en xileno por espacio de 5 min y montados con cubreobjetos y la resina bálsamo de Canadá.

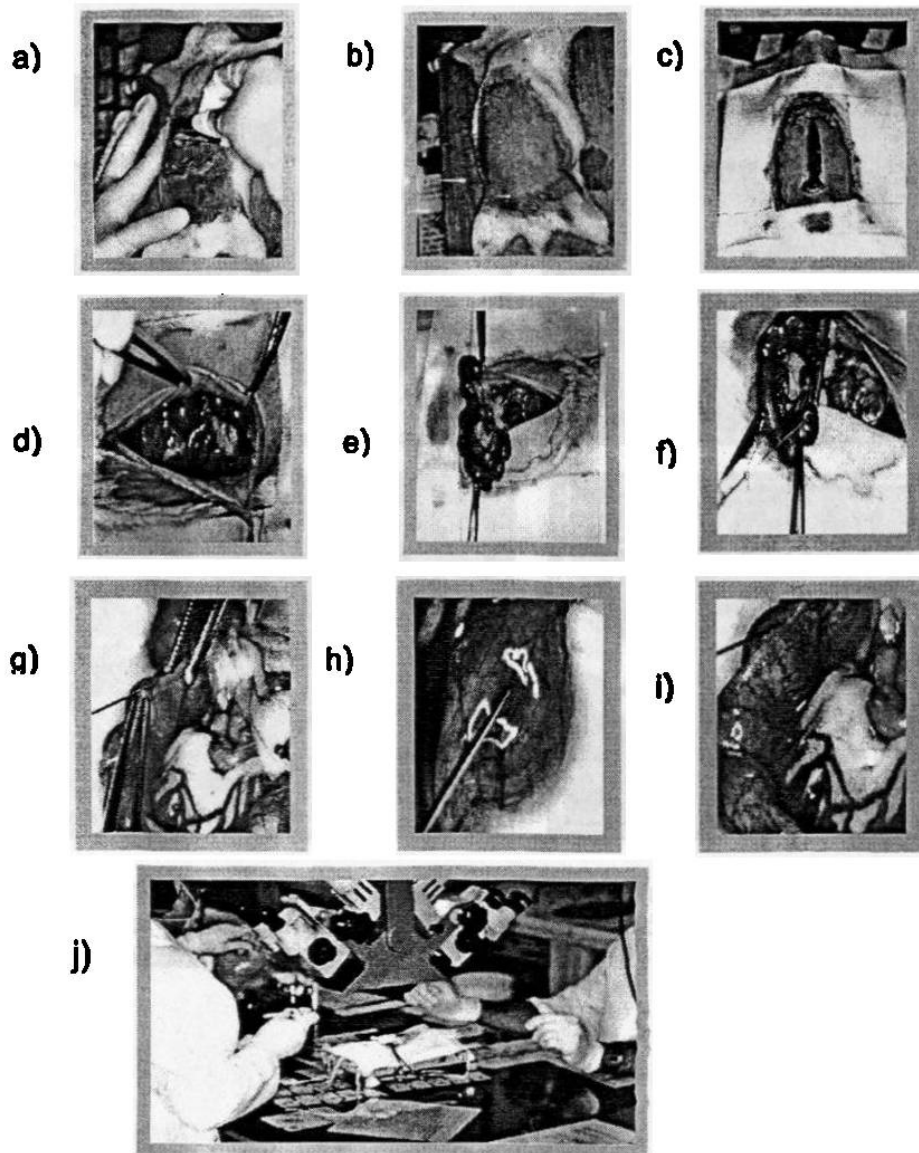
#### **V.II.VII.II. Tinción para X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D galactósido) y rojo rápido nuclear.**

Estos cortes se hicieron con el mismo tratamiento de hidratación que los procesados por hematoxilina y eosina. Valiéndose de la mezcla de solución de revelado ( $K_3Fe(CN)_6 + K_4Fe(CN)_6$  200mM, deoxicolato de sodio 0.024 M, NP-40 2 ml, MgCl 1M) y solución de tinción X-gal (X-gal 0.097M en formamida), las laminillas fueron conservadas en la solución por espacio de 2 horas hasta un lapso no mayor a 3 días. Se realizó la contratinción con rápido rojo nuclear ( $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  0.075M, 0.5 g de rojo rápido nuclear y timol). El proceso de montaje fue similar al mencionado anteriormente para las otras distinciones. Las laminillas fueron analizadas bajo microscopía de luz (Microscopio Zeiss) a 10, 40 y 60X.

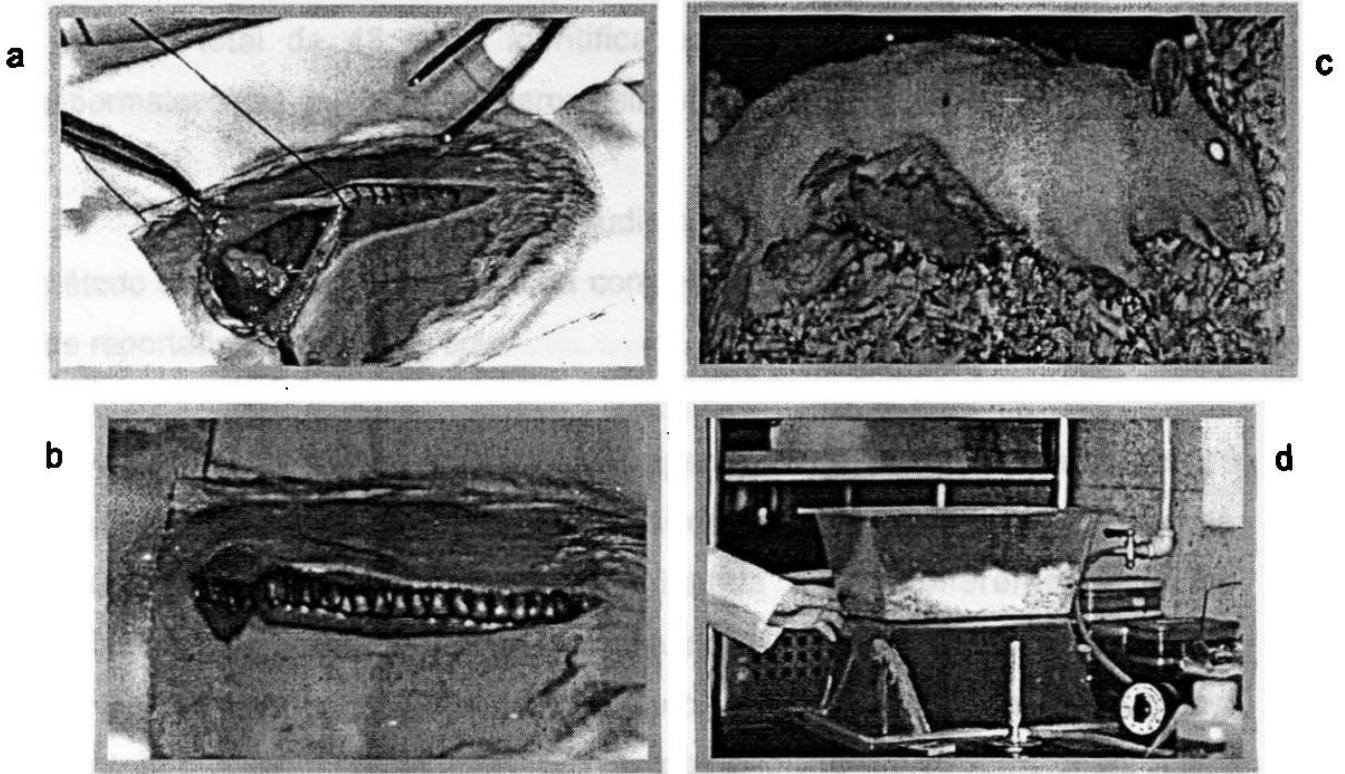
#### **V.II.VIII. Inmunohistoquímica.**

Para realizar el análisis inmunohistoquímico se desparafinizaron e hidrataron las muestras hasta un lavado final en buffer de fosfatos. Se bloqueo con peroxidasa endógena en PBS por espacio de 30 min. Paso seguido, se adicionó el bloqueador por espacio de 30 min a temperatura ambiente.

La adición del anticuerpo primario por 3 min fue seguida por posteriores lavados con buffer de fosfatos, para finalmente añadir el anticuerpo secundario. La adición del conjugado enzimático y el sustrato cromógeno constaron ambos de 5 min, para finalmente lavar con agua destilada y contrastar con hematoxilina de Mayer y montar las muestras valiéndose de cubreobjetos y bálsamo de Canadá.



**Figura 6.** Laparotomía con exposición de cuernos uterinos. Las fotografías muestran las técnicas de asepsia y antisepsia del área quirúrgica, a y b. La incisión en cavidad abdominal de carácter longitudinal, c. Disección y aislamiento de cuernos uterinos, d y e. Transducción a los productos gestantes ( $1 \times 10^{10}$  p.v.) valiéndose del microscopio estereoscópico Carl Zeiss f 125, f, g, h, i y j.



**Figura 7. Cierre de heridas quirúrgicas y recuperación post-operatoria. a y b): Suturación mediante la técnica de surjete continuo por planos con candado. c y d). Disposición lateral del animal para su recuperación cerca de una fuente de calor.**

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.I. Conformación de los grupos experimentales.**

Un total de 48 ratas identificadas como gestantes (presencia de espermatozoides en citología) fueron utilizadas con los siguientes propósitos:

Una rata fue utilizada en un estudio piloto para determinar la viabilidad del método de laparotomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos, como fue reportada por Liphutz y cols.

Seis ratas fueron sometidas a laparotomía exploratoria en diferentes estadios de gestación para determinar si estas ratas sobrevivirían al proceso operatorio y a la carga viral administrada en los diferentes estadios gestacionales propuestos para este estudio. De las anteriores, una rata fue sometida al proceso quirúrgico a las 9 d.p.c., otra rata fue tratada a los 12 días, mientras que tres ratas fueron intervenidas a los 15 d.p.c. También se utilizó una rata para ser transducida intravenosamente (i.v.), al mismo tiempo que se realizaban las transducciones intra-amnióticas (i.a.).

El grupo de transducción i.v. estuvo constituido por 21 ratas distribuidas de la siguiente manera:

- 10 ratas fueron transducidas a los 12 d.p.c.
- 10 ratas fueron transducidas a los 15 d.p.c.
- Una rata fue transducida para reemplazar a alguna rata de cualquiera de los grupos que muriera por efectos de la carga viral.

El grupo de transducción i.a. estuvo formado por 17 ratas, las cuales fueron distribuidas en dos grupos:

- 9 ratas fueron transducidas a las 12 d.p.c.
- 8 ratas fueron transducidas a los 15 d.p.c.

- Tres ratas (controles negativos para ambas transducciones) permanecieron sin realizarles ningún tipo de transducción, dejando que el período gestacional llegara a término. Éstas fueron colocadas en cajas separadas sin ser perturbadas hasta el día del parto.

A la mañana siguiente del parto, los recién nacidos fueron observados y valorados para determinar la presencia de malformaciones espontáneas. Las extremidades anteriores posteriores, las estructuras faciales y la linealidad en la cola presentaron patrones normales de desarrollo. No se observaron variaciones considerables en pesos y medidas con respecto a los determinados en las transducciones intravenosas, aunque si fue el caso entre los diferentes grupos transducidos de manera i.a.

#### **VI.II. Laparotomía exploratoria (estudio piloto con una rata).**

El proceso quirúrgico fue realizado en una rata gestante de 17 d.p.c. con los siguientes propósitos:

- 1) Saber si la rata sobrevivía el proceso quirúrgico.
- 2) Conocer tanto la distribución, morfología y posición de los fetos en el cuerno uterino.
- 3) Establecer si el calibre de la aguja utilizada causaba algún daño y por tanto alteración en el equilibrio osmótico del líquido amniótico, así como también,
- 4) Establecer las condiciones idóneas para los procesos transduccionales posteriores.

La rata gestante permaneció anestesiada por espacio de dos horas (tiempo medido desde la ausencia total de movimiento hasta la detección de reflejo pupilar y movimiento letárgico restringido), tiempo suficiente para permitir la realización del proceso quirúrgico. Se realizó la inyección de cinco fetos de un total de diez. Se inyectaron un total de 100  $\mu$ l por feto de una mezcla de solución

salina y rojo neutro (10:1). Las inyecciones realizadas fueron exitosas ya que se pudo comprobar que el saco amniótico era capaz de recibir un volumen considerable de líquido. Sin embargo, tres de los cinco fetos evidenciaron algunas vesículas hemorrágicas, lo que sugirió que una disminución en el volumen a inyectar daría mejores resultados. Al día siguiente la rata mostraba pelo eréctil y letargia, pero sin complicaciones aparentes al proceso quirúrgico. Pasados tres días, la rata fue sacrificada, siendo los fetos liberados del cuerno uterino y de sus sacos amnióticos respectivos. Dos fetos mostraban daño por la punción realizada. Un feto poseía un orificio localizado en el dorso en su porción superior y el segundo presentaba un proceso necrótico a nivel de la cola y pata derecha. El resto de los fetos inyectados fueron encontrados normales y sin ninguna alteración aparente. Todos los fetos mostraron movimiento antes de ser extraídos de sus sacos amnióticos (Figuras 8 y 9).

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10

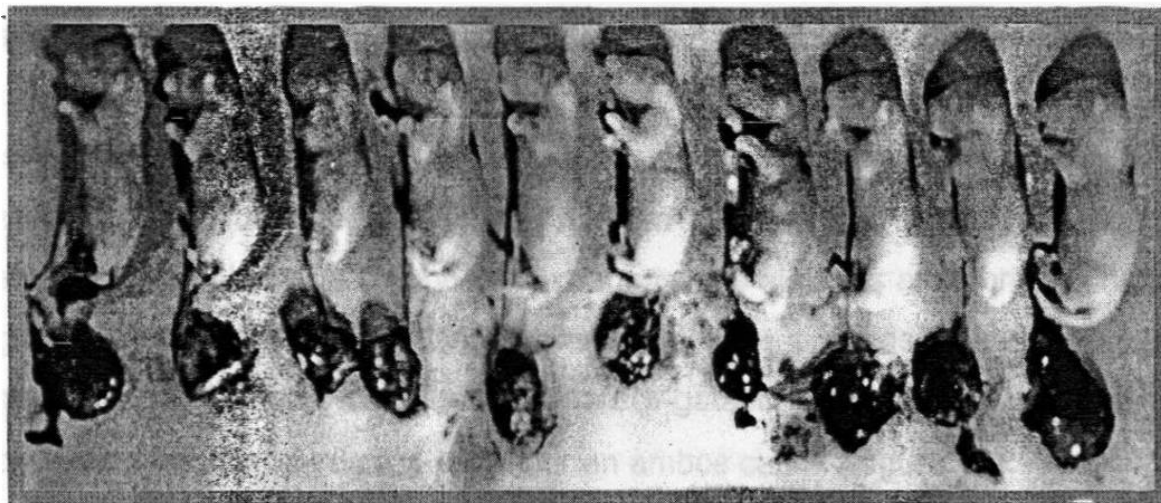
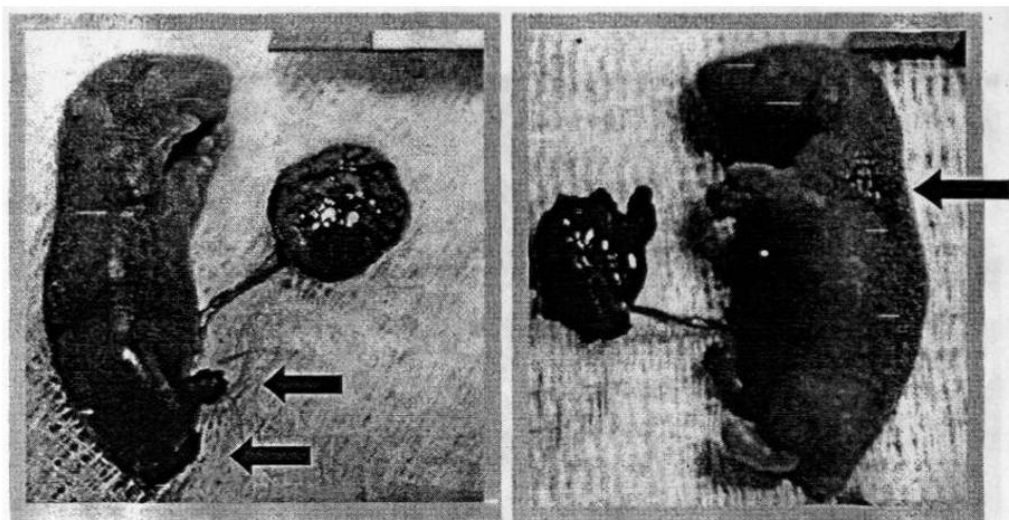


Figura 8. Fetos extraídos de los cuernos uterinos a los 20 d.p.c. (punción realizada a los 16 días de gestación). Inyección de 100  $\mu$ L de solución salina: Rojo neutro (10:1) a los fetos 1, 2, 3, 5 y 7), una vez realizado el proceso de laparotomía y su liberación de sus respectivos sacos vitelinos. La fotografía muestra también las placentas y los cordones umbilicales completos.

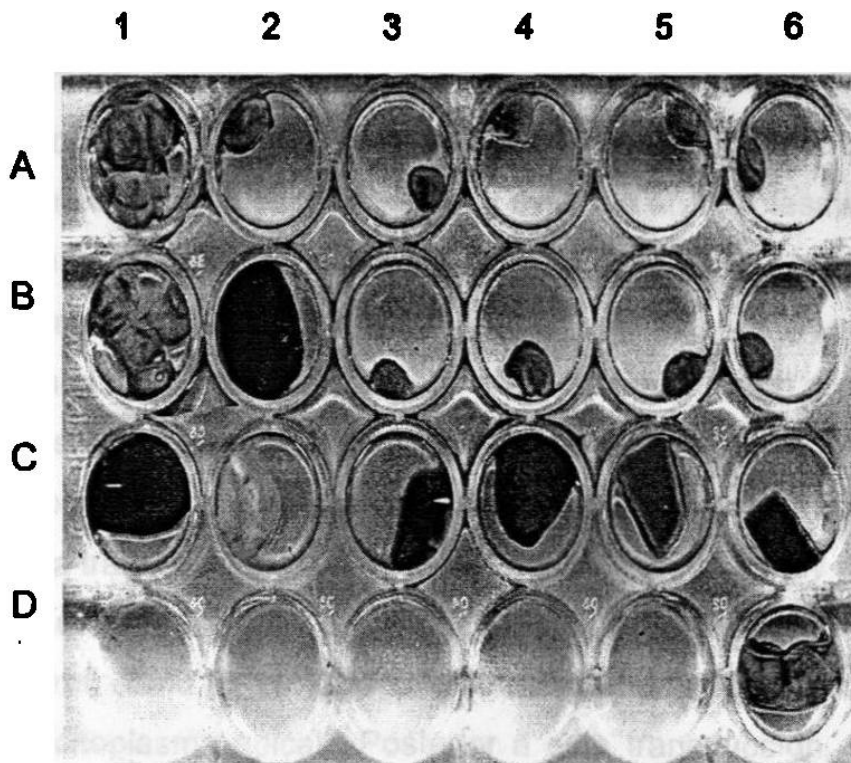




**Figura 9. Fetos con anomalías en el estudio piloto. El feto de la izquierda (feto 1 de la figura anterior) presenta necrosis de la extremidad posterior derecha y la cola. El otro feto (feto 7 de la figura anterior) muestra una herida punzante en la unión del cuello y el dorso con inflamación y necrosis.**

### **VI.III. Escalamiento de dosis virales.**

Este grupo estuvo integrado por 6 ratas. La primera rata fue transducida a los 9 d.p.c. A esta rata le fue administrada una carga viral de  $1 \times 10^{10}$  p.v. por cada embrión transducido. Se transdujeron diez embriones con la misma carga viral y a cuatro embriones en el cuerno uterino del lado opuesto (controles) se les administró una mezcla de solución salina y rojo de fenol (10:1). Las transducciones fueron realizadas de manera tangencial y tratando de que el vector adenoviral entrara en uno de los flancos más alejados al embrión con una aguja calibre 28. La rata falleció horas más tarde. Los órganos de la madre y los embriones fueron extraídos y teñidos para  $\beta$ -galactosidasa con la finalidad de observar la distribución tisular del vector en ambos casos (Figura 10).



**Figura 10. Órganos maternos y de embriones transducidos con el vector AdLacZ. A1 y B1. Cuerno uterino al cual le fueron removidos los embriones. A2-6 y B3-6. Embriones liberados del cuerno uterino y sacos vitelinos respectivos. B2. Corte sagital de riñón materno. C1. Porción media del bazo. C2. Corte sagital de cerebro. C3 Pulmón izquierdo. C4 Corte sagital de corazón. C5 y C6 Cortes aleatorios de porciones del hígado. D6. Embriones transducidos aún dentro del cuerno uterino.**

Varios órganos de la madre (riñón, hígado y bazo) mostraron coloración azul. Los embriones del cuerno que fue transducido fueron conservados en tinción por más de tres días, pero no desarrollaron una coloración aparente. A pesar que no se evidenció un color para el vector utilizado, el análisis histológico reveló que 7 de los 10 embriones transducidos fueron positivos para la tinción con  $\beta$ -galactosidasa. El análisis histológico para el embrión mostró que el vector está localizado básicamente en la zona de transducción y de manera escasa en otros órganos.

Los resultados del análisis histológico para los órganos maternos evidenciaron un comportamiento igual al observado macroscópicamente. El cuerno uterino fue transducido de manera intensa, mientras el corazón y la

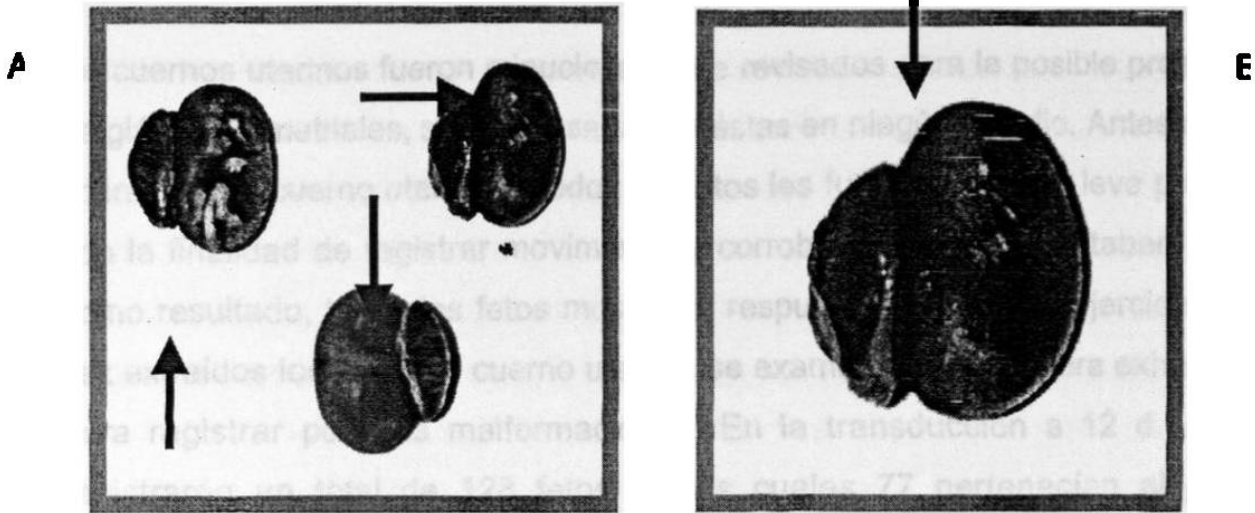
placenta mostraron negatividad para el vector. Ninguno de los órganos macroscópicamente negativos para la tinción de  $\beta$ -galactosidasa fue positivo en el estudio histopatológico. El riñón se encontró transducido en el epitelio de los túbulos proximales, siendo esta tinción muy evidente en citoplasma y núcleo. El hígado mostró transducción en los hepatocitos de los centros lobulillares, tanto en el citoplasma como en la membrana. Los colangioloos fueron positivos en el citoplasma. En el bazo se observó un alto nivel de transducción con la presencia de macrófagos. La presencia de macrófagos no fue exclusiva del bazo, pues también se observó en los pulmones, en el epitelio bronquial y en los bronquiolos. La transducción en el encéfalo fue abundante y muy diversa, sobre todo en las neuronas. El vector fue encontrado en las células de Purkinje (tanto en el citoplasma, como en el núcleo), en células endoteliales y en el conducto endimario (citoplasma apical). Posterior a esta transducción, se realizaron otras tres transducciones a dosis decrecientes, hasta un valor de  $1 \times 10^8$  p.v. totales. En ninguna de ellas se logró que la rata sobreviviera a la laparotomía.

La segunda, tercera y cuarta rata fueron transducidas a los 15 d.p.c. con cargas virales de  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^8$  p.v. totales por embrión transducido. Se transdujeron un total de 12 embriones y una cuantía igual fungieron como controles. Los 39 embriones restantes no fueron transducidos. Los resultados para los órganos maternos mostraron un comportamiento similar a aquellos observados para la rata transducida al noveno d.p.c. Estas ratas, a diferencia de las primeras, sobrevivieron el proceso quirúrgico y sólo mostraron letargia y pelo eréctil, sin variación en la temperatura corporal el día posterior a la realización de la operación y hasta el día de su sacrificio. El análisis histológico de los embriones mostró una transducción muy particular. El vector se encontró en la piel y dermis, en la región bucal, en el epitelio nasal, epitelio nasofaríngeo y escasamente en el epitelio bronquial. También, se registró que los fetos presentaron transducción en el intestino delgado medio, siendo muy evidente en las zonas cercanas a los procesos de descamación (tinción intracitoplasmática y nuclear).

Acorde con los resultados obtenidos en las trasducciones al 9 d.p.c., se decidió que a la quinta rata transducida a los 12 d.p.c. se le administraría una carga viral de  $1 \times 10^8$  p.v. totales por embrión transducido. Sólo cuatro embriones fueron inyectados de un total de 12, dos con vector y dos con solución salina. Sin embargo la rata no sobrevivió el proceso quirúrgico. De igual manera los embriones y los órganos de la madre fueron procesados tanto para la tinción de  $\beta$ -galactosidasa, como para el análisis histológico. Los resultados de ambos análisis son muy similares a los obtenidos para las ratas transducidas a los 15 d.p.c., pero en este caso los embriones sólo muestran transducción en la zona aledaña al sitio de punción.

La sexta rata transducida de manera intravenosa, recibió una dosis única de  $1 \times 10^{11}$  p.v. totales a los 12 d.p.c. Una vez cumplidos los 15 d.p.c., la rata fue sacrificada. Se obtuvieron un total de 13 embriones todos normales y sin ninguna malformación aparente. Tanto los embriones como los órganos de la madre fueron sometidos al proceso de tinción para el vector. Los embriones fueron liberados del cuerno uterino y de sus sacos y sólo algunos fueron mantenidos dentro de ellos para exponerlos a la tinción. Ningún embrión mostró una coloración en sistema tegumentario externo.

Los resultados de los embriones que fueron mantenidos en sus sacos amnióticos mostraron coloración en la parte radial a la placenta del saco amniótico, pero esta última no desarrolló una coloración para el vector (Figura 11). El análisis histológico reveló que el único tejido transducido fue el intestino delgado medio en el embrión. Los órganos de la madre por su parte muestran grados de transducción de intensidad decreciente (tinción citoplasmática y nuclear) en cuernos uterinos, riñones, bazo, hígado y cerebro.



**Figura 11. Análisis de la transducción intravenosa para  $\beta$ -galactosidasa, realizada a los 12 d.p.c. con  $1 \times 10^{11}$  p.v. totales. Embriones de 15 d.p.c. que permanecen en sus sacos vitelinos. A. Las flechas indican la presencia del vector cuya distribución es siempre radial a la placenta. B. Magnificación de uno de los fetos en fotografía. A.**

#### **VI.IV. Estudios de transducción y toxicidad materno-fetal.**

##### **VI.IV.I. Transducción Intravenosa (i.v.).**

De cada transducción intravenosa, se designaron 5 ratas para ser transducidas con el vector adenoviral y las 5 restantes fueron controles del estudio. Tanto estas ratas como las destinadas para la transducción intra-amniótica tenían alrededor de tres meses de edad y sólo hubo una variación de tres meses y medio con aquellas que fueron preñadas y mantenidas sin manipulación hasta el final del estudio (3 ratas, controles externos).

El vector adenoviral fue inyectado mediante punción única en la vena caudal de la cola de la rata, siendo administrados 100  $\mu$ l de vector y 100  $\mu$ l de solución salina a los controles. Se utilizó éter como agente sedante. Sólo tres ratas presentaron una alteración en su comportamiento, registrándose pelo eréctil 24 horas después de la transducción. Ninguna rata presentó letargia o alteración en la temperatura pasadas 48 hrs de la transducción.

Una vez sacrificadas, los cuernos uterinos exhibieron una coloración normal y ninguno de ellos presentó reabsorción parcial o total de fetos. Todos

los cuernos uterinos fueron minuciosamente revisados para la posible presencia de glándulas metriales, sin ser observadas éstas en ningún estadio. Antes de ser liberados del cuerno uterino, a todos los fetos les fue ejercida una leve presión, con la finalidad de registrar movimiento y corroborar que estos estaban vivos; como resultado, todos los fetos mostraron respuesta al estímulo ejercido. Una vez extraídos los fetos del cuerno uterino, se examinaron de manera exhaustiva para registrar posibles malformaciones. En la transducción a 12 d.p.c. se registraron un total de 128 fetos de los cuales 77 pertenecían al grupo transducido y 51 al grupo control. En la transducción a 15 d.p.c. se registraron un total de 120 fetos, 60 del grupo transducido y 60 del grupo control.

En el análisis macroscópico todos los fetos mostraron una distribución normal de sus órganos externos. Las extremidades posteriores y anteriores poseían digitaciones completas, movimientos rotacionales normales y ángulos posturales también de carácter normal. Las estructuras faciales (proporciones de comisuras nasales y bucales) también fueron normales, así como la curvatura de la espina dorsal. La cola de todos los fetos mantuvo su carácter lineal y la relación cuerpo: cabeza (1:3) se mantuvo dentro de los estándares normales, sin variaciones considerables. De igual manera, todos los fetos fueron medidos, pesados y colocados posteriormente en cajas de Petri conteniendo formaldehído al 10%. Una vez cumplidas las 24 horas fueron examinados por segunda vez por el patólogo quien corroboró los resultados.

#### **VI.IV.I.I. Análisis anatomopatológico.**

##### **VI.IV.I.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre.**

El análisis anatomopatológico en las madres evidenció transducción en todos los órganos disectados. El mayor grado de transducción con el vector adenoviral se registró en ambos riñones, principalmente en los túbulos contorneados proximales. A éstos, le siguió el bazo, mostrando una migración del vector de la zona basal a la zona apical. En el hígado, el vector transdujo

casi todas las estructuras hepáticas como: sinusoides hepáticos, hepatocitos, región centro lobulillar, triada portal y conductillos biliares. El cuerno uterino presentó un grado de transducción considerable y fue observado en todos los cortes analizados de las ratas que fueron transducidas. El cerebro mostró una transducción inusual, aunque muy leve, de los plexos coroideos, meninges y neuronas. Los pulmones también evidencian transducción en tejido bronquial y alveolar con una demarcación de macrófagos. No existió una diferencia significativa en el patrón de transducción para los dos diferentes estadios de transducción.

#### **VI.IV.I.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos.**

De un total de 248 fetos, el 42.26% fueron hembras, 40.24% fueron machos y al 17.47% no se les identificó tejido de líneas germinales. El sexo de los fetos fue determinado por la presencia de testículos (Figura 12).

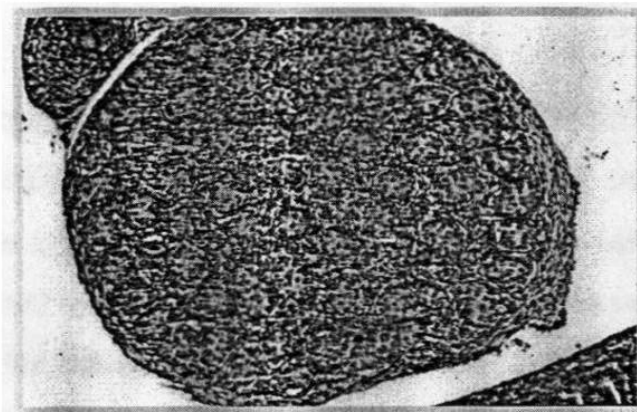
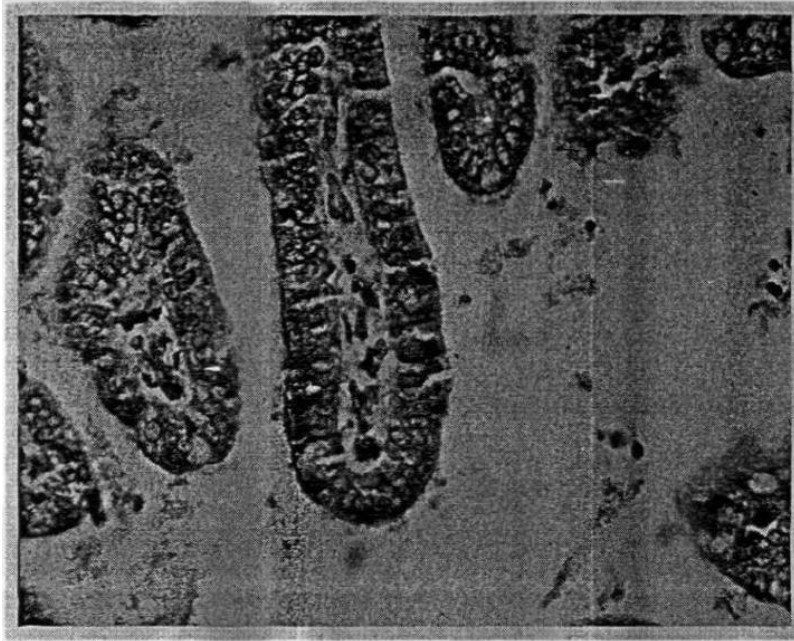


Figura 12. Testículos normales de feto a los 19 d.p.c. Tinción H/E (40X). La ausencia o presencia de esta glándula fue el criterio base para la determinación del sexo en los embriones.

En las madres transducidas el vector pasó la barrera placentaria y se observó intensa transducción del intestino delgado de los fetos, la cual se demuestra desde las capas basales hasta la luz del intestino (Figura 13).

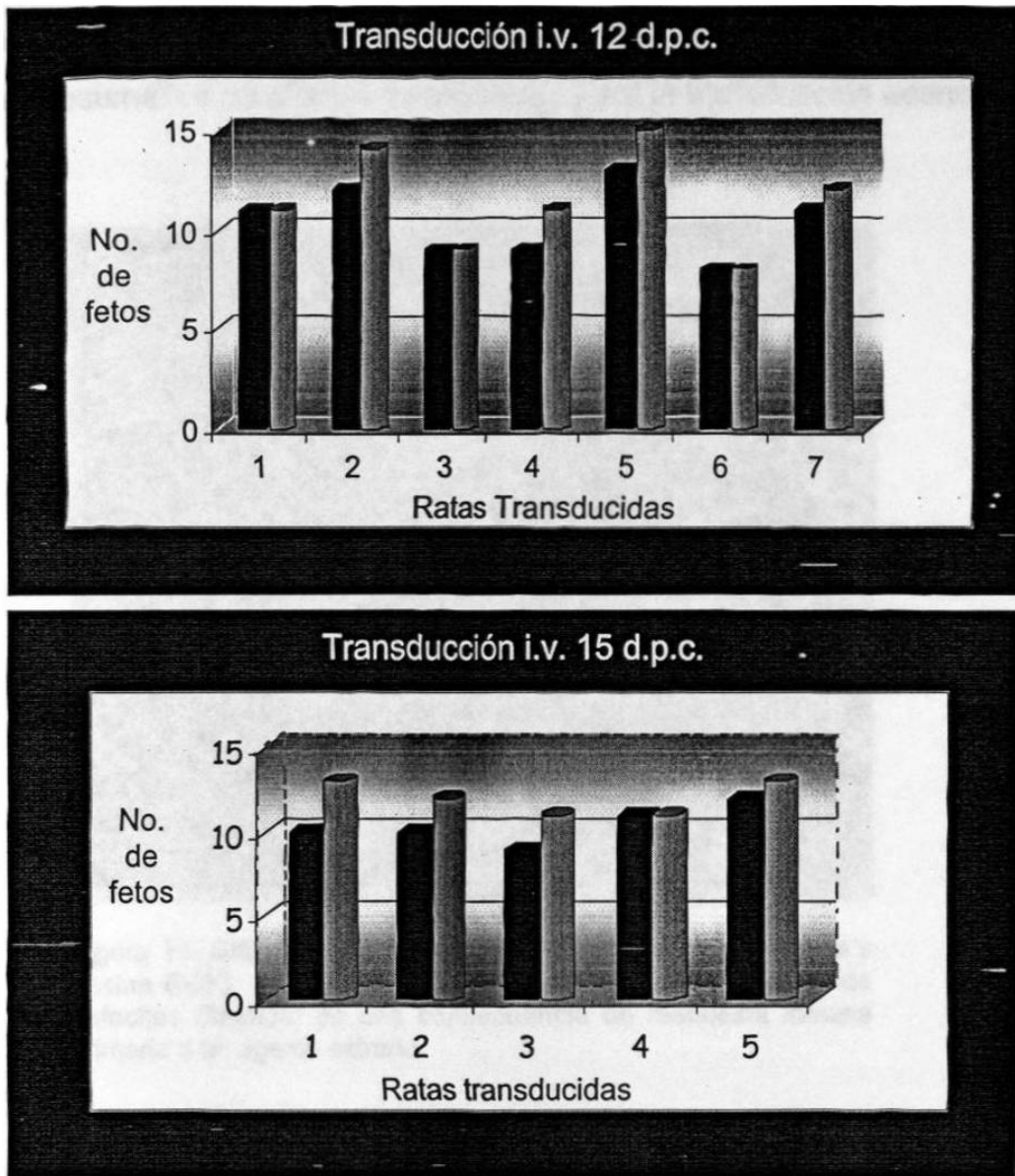




**Figura 13..Intestino delgado de feto a los 19 d.p.c. transducido vía i.v. Tinción X-gal (60X). La distribución del vector esta demarcada principalmente en tejido de la zona basal.**

Ningún otro órgano del feto exhibió transducción cuando fue analizado por la tinción para detección de  $\beta$ -galactosidasa. La tinción leve del cordón umbilical en dos fetos, no fue observada en estadios tardíos. La membrana amniótica conservó su positividad tanto para la transducción a 12 días como a 15 días. Un 85% a un 90% de los fetos transducidos analizados mostraron transducción adenoviral (figura 14).

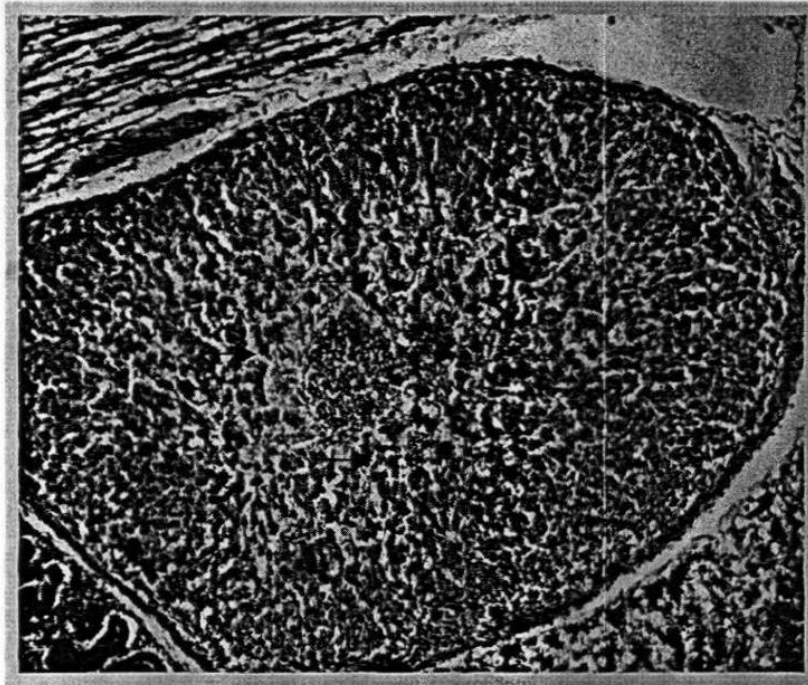




**Figura 14.** Comparación de la eficiencia de transducción fetal. Fetos que evidenciaron presencia del vector (barras azules) versus el número total de fetos transducidos (barras anaranjadas). Eficacia de transducción 85-90%.

La tinción con hematoxilina y eosina evidenció normalidad para el intestino delgado en todos los cortes analizados, sin alteraciones patológicas de ninguna índole. En tres fetos, sin embargo, se encontraron abundantes linfocitos en la glándula suprarrenal y en un feto se encontraron signos de metaplasia escamosa intestinal (Figura 15). Así mismo, se detectó la presencia de bacteria en el espacio subepidérmico en 5 fetos analizados (Figura 16). El análisis

inmunohistoquímico sin embargo, no revela la presencia del vector adenoviral en dichas estructuras. La presencia de linfocitos en glándulas suprarrenales sólo estuvo asociada a la presencia de bacteria en fetos contiguos de una sola rata. La Tabla 8 resume los resultados encontrados para la transducción adenoviral.



**Figura 15. Glándula suprarrenal fetal. Tinción de hematoxilina y eosina (60X). Transducción i.v. a los 15 d.p.c. La presencia de linfocitos (flechas) es una consecuencia de respuesta inmune primaria a un agente extraño.**