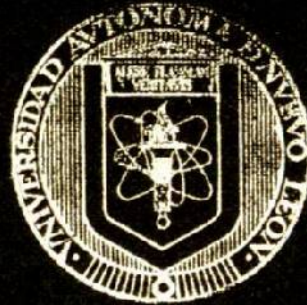


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACION CON VECTORES
ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD
TERAPEUTICA Y LA TOXICIDAD DE LA
TERAPIA GENICA ANTITUMORAL**

**Por
M.C.P. ANDRES HERNANDEZ GARCIA**

**Como Requisito Para Obtener El Grado De DOCTOR
EN CIENCIAS Con Especialidad En Biología Molecular
e Ingeniería Genética**

**MONTERREY, NUEVO LEON
JUNIO DEL 2002**

TD
RM301
.3
.G45
H4
c.1



1080114182

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES
ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA Y LA
TOXICIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL**

**POR
M.C.P ANDRES HERNÁNDEZ GARCÍA**

**Como Requisito Para Obtener El Grado De DOCTOR EN CIENCIAS
Con Especialidad En Biología Molecular E Ingeniería Genética**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN
Junio del 2002**

TD
RM301
.3
.645
H4
,

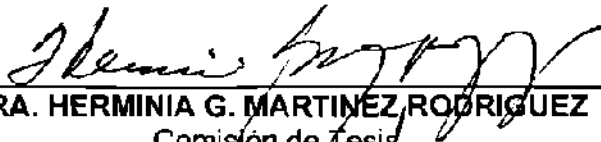


**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES
SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPEÚTICA Y LA TOXICIDAD DE LA TERAPIA
GÉNICA ANTITUMORAL**

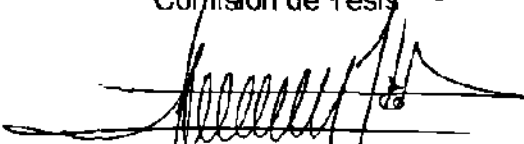
Aprobación de la Tesis:



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



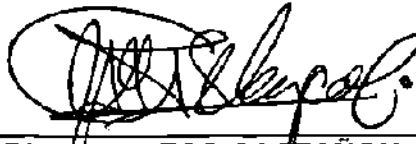
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ GUERRERO
Comisión de Tesis



DR. JACINTO ESTEBAN MARÍA
Comisión de Tesis



DR. GERARDO VELAZCO CASTAÑÓN
Comisión de Tesis



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

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA

Agradecimientos.....	iv
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Figuras	vi
Resumen	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La Terapia Génica: Una Innovadora Estrategia Terapéutica	1
1.2 Terapia Génica Ex Vivo.....	1
1.3 Terapia Génica In Vivo	2
1.4 Los Primeros Intentos En El Campo De La Terapia Génica.....	3
1.5 El Surgimiento De Normas De Bioseguridad Para El Manejo Del ADN Recombinante.....	3
1.6 Requisitos Para Iniciar Un Programa De Terapia Génica.....	4
1.7 Estrategias Para La Transferencia Génica.....	5
1.8 Definición De Vector	6
1.9 Retrovirus Como Vectores En Terapia Génica	6
1.10 Adenovirus Como Vectores Recombinantes En Protocolos De Terapia Génica.....	9
1.11 Ventajas De Los Vectores Adenovirales En Terapia Génica.....	12
1.12 Principales Inconvenientes De Los Vectores Adenovirales.....	14
1.13 La Terapia Génica De Los Trastornos Genéticos	14
1.14 La Terapia Génica Suicida	15
1.15 Terapia Génica Profiláctica (Genoprofilaxis).....	18
2. ANTECEDENTES	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ETAPAS EXPERIMENTALES	22
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. HIPOTESIS	30
5.1 Hipótesis De Trabajo.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1 Objetivos Generales	31
6.2 Objetivos Particulares	31
7. MATERIAL Y METODOS.....	33
7.1 Material	33
7.1.1 Virus y Vectores.....	33
7.1.2 Animales.....	33
7.1.3 Líneas Celulares	34
7.2 Métodos.....	34
7.2.1 Ensayo De Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	34
7.2.2 Ensayo De Neutralización (Adenovirus Neutralization Assay).....	35
7.2.3 Ensayo De La Proteína Verde Fluorescente (GFP-Assay).....	36
7.2.4 Ensayo De Luciferasa.....	38
7.2.5 Tumorigénesis	39
7.2.6 Recolección De Tejidos	39
7.2.7 Recolección De Muestras De Suero.....	39
7.2.8 Análisis Enzimáticos.....	39
7.2.9 Estudio Anatomopatológico	40
7.2.10 Análisis Estadísticos.....	40

7.2.11	Diseño Experimental De La Primera Etapa De Investigación (Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros)	41
7.2.12	Diseño Experimental De La Segunda Etapa De Investigación (Investigación De Los Efectos De La Inyección Intratumoral De Dosis Crecientes De Adenovirus En Ratones Normales Y Preinmunizados.)	43
7.2.13	Diseño Experimental De La Tercera Etapa De Investigación. (Disminución De La Inmunogenicidad De Los Vectores Adenovirales A Través De Su Encapsulación (Pegilación) Con Polímeros De Polietilenglicol.)	45
8.	RESULTADOS	47
8.1	Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros.	47
8.2	Investigación de los Efectos de la Inyección Intratumoral de Dosis Crecientes de Adenovirus en Ratones Normales y Preinmunizados.	57
8.3	Desarrollo de Esquemas para Disminuir la Inmunogenicidad de los Vectores Adenovirales.....	65
9.	DISCUSIÓN	68
10.	CONCLUSIONES	75
11.	BIBLIOGRAFÍA	77

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE, *en reconocimiento a su abnegación, ternura y calidad humana.*

A MI PADRE, el Sr. Andrés Hernández García. *Con admiración y cariño*

A quien es motivo de mi vida, mi alegría y mis más puros sentimientos, MI ESPOSA

Patricia de la Peña de Hernández.

Para MIS HIJOS: Alessandra, Andrés, Alberto y Alejandro, quienes son el fundamento de mis anhelos, mis principios, mis propósitos y mi futuro.

A MIS HERMANOS con el deseo de que continúen en el camino de la honestidad y la humildad.

Para el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, con gratitud por su irrestricto apoyo moral y por depositar su confianza en mi formación profesional, distinguiéndome con su desinteresada amistad.

Al Dr. Estuardo Aguilar-Cordova, por brindarme la oportunidad de culminar mi trabajo de tesis dentro de su laboratorio y enseñarme los innovadores métodos de la terapia génica, en un ambiente de amistad, cordialidad y entusiasmo.

A la Doctoras Herminia G. Martínez Rodríguez y Agnes Revol de Mendoza por su amistad, interés y comprensión a lo largo de mi formación profesional dentro de la ULIEG.

A la comisión de Tesis: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Dr. Augusto Rojas Martínez, Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, Dr. Gerardo Velazco Castañón, Juan F. González Guerrero y Dr. Jacinto Esteban María.

Al Ing. José María Fraustro Siller, Actual Subsecretario de Educación Pública y Ex-Rector de la Universidad Autónoma de Coahuila, por su distinguida amistad e inquebrantable apoyo durante los momentos más difíciles de mi desarrollo profesional.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, Director de la Facultad de Medicina de la UANL por sus oportunas palabras de aliento, compañerismo y amistad demostrados durante esta importante etapa de mi vida.

A los funcionarios de la U.A. de C. Lic. Mario A. Ochoa Rivera, Ing. Jesús Mendoza Rodríguez, y Arq. Javier Reyes Engstrom, por su amistad y todas las atenciones recibidas.

A MIS AMIGOS de Houston Texas y a todos los integrantes del Gene Vector Laboratory por hacer mi estancia en los USA agradable y placentera.

A mis amigos de la ULIEG, por la solidaridad mostrada durante la realización de mis actividades de investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Universidad Autónoma de Coahuila y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante la realización de mi Doctorado.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA: Enzima Adenosin-deaminasa.
ALT: Enzima Alanin Amino Transferasa.
APSE Antígeno Prostático Seroespecífico.
AdVFT2M59: Adenovirus carente de genes que codifican para proteínas reporteras.
AdV-GFP: Adenovirus portador del gen que codifica para la proteína verde fluorescente.
AdV-Luc: Adenovirus portador del gen que codifica para la enzima luciferasa.
AdV-Luc+MPEG: Adenovirus recubierto con mono-metoxipoli(etilenglicol).
AdV-Luc+TMPEG: Adenovirus recubierto con tresil-monometoxi poli(etilenglicol).
AdV-5: Adenovirus recombinante tipo 5
cADN: Ácido Desoxirribo-Nucleico complementario
ALP: Enzima Fosfatasa Alcalina.
AST: Enzima Aspartato Amino Transferasa.
CFTR: Regulador de Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística.
CMV: Citomegalovirus.
CPE: Efecto Citopático.
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
env: Gen que codifica para los componentes de la envoltura del virión.
FSK: Células murinas del epitelio mamario.
gag: Gen que codifica para una poliproteína destinada a formar la cubierta interior del retrovirus.
GCV: Ganciclovir.
GFP: Proteína Verde Fluorescente.
GVL: Gene Vector Laboratory.
HSV-TK: Virus del Herpes Simple portador del gen de la Timidin Kinasa
IL-2: Interleucina 2.
IT: Intratumoral.
pol: Gen que codifica para la enzima transcriptasa reversa.
LTR: Long Terminal Repeats.
Luc: Luciferasa.
MEM: Medio de cultivo esencial mínimo
MPEG: Monometoxipoli(etilenglicol).
NIH: Institutos Nacionales de Salud.
PBS: Amortiguador de fosfatos (Phosphate Buffer Solution)
PEG: Poli(etilenglicol).
UCLA: University of California-Los Angeles.
RAC: Recombinant DNA Advisory Committee.
RAG-2: Cepa de ratones inmunodeficientes.
RPM: Revoluciones por minuto.
RSV: Virus del Sarcoma de Rous.
SMH: Sistema Mayor de Histocompatibilidad.
SNC: Sistema Nervioso Central.
TCID₅₀: 50% de la dosis infectiva en cultivo de tejido.
TM40-D: Línea celular que produce tumores mamarios en el ratón.
TMPEG: Tresil-mono metoxipoli(etilenglicol).
TK: Enzima Timidin Kinasa.
V.P/tumor: Número de partículas virales por tumor.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Estrategias de terapia génica.....	2
Figura 2. Genoma Retroviral.....	7
Figura 3. Mecanismo de integración de Retrovirus	8
Figura 4. Fabricación de adenovirus recombinantes.....	12
Figura 5. Mecanismo de acción del Ganciclovir.....	17
Figura 6. Terapia Génica Profiláctica	19
Figura 7. Interferencia inmunológica en la terapia génica con vectores adenovirales.....	21
Figura 8. Patrón de diseminación y hepatotoxicidad de un AdV-vector que codifica para luciferasa	23
Figura 9. Escenarios de hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado	24
Figura 10. Inyección Intratumoral de Megadosis de Adv-Luciferasa.....	25
Figura 11. PEGilación de Adenovirus.	27
Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA.....	35
Figura 13. Microfotografía de células tumorales transducidas con AdV-GFP.....	37
Figura 14. Representación esquemática del ensayo de Luciferasa	38
Figura 15. Diseño Experimental de la Primera Etapa	41
Figura 16. Estrategia General de la Primera Etapa	42
Figura 17. Estrategia General de la Segunda Etapa	44
Figura 18. Estrategia General de la Tercera Etapa.....	46
Figura 19. Gráfico de los Títulos de Anticuerpos Contra rAdV-5 Por ELISA.....	48
Figura 20. Titulación de Anticuerpos Neutralizantes en contra de rAdv-5	49
Figura 21. Actividad de Luciferasa en el Grupo Control durante los días 16, 21 y 28.....	50
Figura 22. Actividad de AdV-Luc en Ratones Normales y Preinmunizados.....	52
Figura 23. Expresión Intratumoral de AdV-Luc en los grupos de estudio	52
Figuras A, B y C. Expresión de la Proteína Verde Fluorescente en diferentes grupos.....	53
Figura 24. Actividad de Luciferasa en los tres grupos de estudio.....	55
Figura 25. Actividad de Luciferasa en el grupo de animales preinmunizados	56
Figura 26. Expresión de AdV-Luc como una función de la dosis en animales Controles	57
Figura 27. Expresión de AdV-Luc como una función de la dosis en animales Preinmunizados	58
Figura 28. Expresión de Luciferasa en Animales Preinmunizados e Inoculados Con Dosis Crecientes de AdV/Luciferasa.....	59
Figure 29. Tasa Tumor/Hígado de Expresión de AdV-Luc en Ratones Control.....	60
Figura 30 Tasa Tumor-Hígado en el Grupo de Ratones Preinmunizados	61
Figura 31. Títulos de Anticuerpos en relación a las dosis crecientes de AdV-Luc.....	62
Figura 32. Hepato-Toxicidad de Adenovirus.....	63
Figura 33. Títulos de Enzimas Hepáticas en los Grupos de Estudio.....	64
Figura 34. Títulos de Anticuerpos en contra Adenovirus Encapsulados con polímeros de Poli-etilen-glicol	65
Figura 35. Actividad de Luciferasa en Día 16 en Ratones Preinmunizados con AdV-FT2M59 y Adenovirus Encapsulados con Polímeros de PEG.....	67
Tabla 1. Titulación de Anticuerpos en contra de rAdv-5 por ELISA	48
Tabla. 2 Titulación de Anticuerpos Neutralizantes en contra de rAdv-5.....	49

RESUMEN

Andrés Hernández García
Universidad Autónoma De Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Marzo del 2002

Área de Estudio: Terapia Génica e Inmunología de los Vectores Adenovirales.

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de Páginas: 83

Título del Trabajo: "EFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA Y LA TOXICIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL"

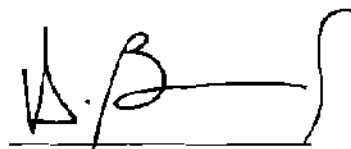
Objetivo: Determinar si la inyección intratumoral de adenovirus portadores de genes reporteros induce, o no, la producción de anticuerpos en contra del vector, y establecer si la presencia de éstos influye en la efectividad terapéutica y toxicidad de la terapia génica del cáncer mediada por vectores adenovirales.

Material y Métodos: El modelo animal de laboratorio utilizado, consistió de una fenocopia de tumores ortotópicos en ratones Balb/c. Cada animal fue inoculado vía subcutánea con células TM40-D a una concentración de 1×10^6 . Después de 3-4 semanas de tumorigénesis, los animales experimentales fueron inmunizados por la inyección intra-tumoral de dos diferentes vectores virales (ADV-GFP o AFT2M59) a una dosificación de 1×10^{11} partículas virales (v.p) /20 μ l; mientras que al grupo control se le inyectó con PBS. Catorce días más tarde, ambos grupos de animales recibieron una inyección intratumoral de un nuevo vector portador del gen de la luciferasa (AdV-Luc), con un rango de dosis que fluctuó entre 2×10^9 a 2×10^{11} p.v./tumor. Los niveles de expresión de AdV-Luc dentro del tumor y en tejidos normales fueron evaluados en función del tiempo (días 2, 7 y 14 después de la administración de AdV-Luc) y la dosis administrada. Para este propósito, se utilizó el ensayo de Luciferasa. Para la cuantificación de anticuerpos contra Adenovirus se utilizó el ensayo de ELISA. Para el estudio de cito-toxicidad, los tejidos fueron evaluados por medio de estudios enzimáticos y anatómo-patológicos. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de Varianza y la prueba "T" de Student.

Resultados: La preinmunización provocó una disminución significativa en la expresión de luciferasa en todos los tejidos, principalmente dentro del tumor (23 X) y a nivel hepático (800 X), durante todos los tiempos de estudio. Sin embargo, en el grupo control, no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la expresión de Luc (en el día 16) entre tumor, hígado, bazo y ovarios, lo cual indica la diseminación sistémica del vector. Por otro lado, en los grupos de animales pre-inmunizados, la expresión de AdV-Luc a nivel tumoral fue significativamente mayor comparada con hígado (33 X), bazo (131 X) y ovario (55 X). Los títulos de anticuerpos contra adenovirus fueron más elevados en los animales pre-inmunizados, indistintamente del tiempo de estudio ($p < 0.11$). El pico de mayor elevación se observó 7 días después de la inyección de AdV-Luc en ambos grupos. El incremento de la actividad de luciferasa relacionado con la dosis, sólo fue observado en los animales preinmunizados. Específicamente, se pudo observar un incremento 30 veces mayor en la actividad de luciferasa en los grupos de mayor dosificación. Notablemente, la expresión intratumoral de luciferasa en estos grupos fue comparable con aquella observada en los animales controles. En el grupo preinmunizado se notó una significativa disminución en la expresión hepática de AdV-Luc, comparada con la de los controles. Sin embargo, no se observó ningún incremento relacionado con la dosis. A diferencia de los animales controles, todos los ratones preinmunizados exhibieron evidencia histológica de hepatitis, la cual fue corroborada por un incremento en los títulos de las enzimas hepáticas.

Conclusiones: En los animales no inmunizados la diseminación de los vectores adenovirales desde el sitio de la inyección es homogénea y de carácter sistémico. La preinmunización ocasiona una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor. El uso de dosis elevadas de vectores virales en animales con inmunidad pre-existente, restituye los niveles de expresión intratumoral a niveles comparables con los observados en animales controles. Sin embargo, los fenómenos de toxicidad hepática observados en los animales pre-inmunizados necesitan ser estudiados con más detalle, debido a las enormes implicaciones terapéuticas que los vectores adenovirales tienen en el tratamiento del cáncer.

Palabras Clave: Adenovirus, Terapia Génica, Preinmunización, Toxicidad, Inmunidad pre-existente.



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor

ABSTRACT

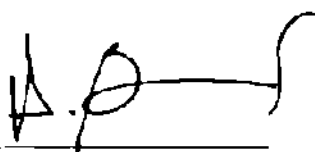
Objective: Preimmunization to adenoviruses may influence the therapeutic effectiveness and toxicity of adenoviral-mediated gene therapy for cancer. This study was undertaken to evaluate the impact of intratumoral preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity.

Materials and Methods: The levels and duration of adenoviral (AdV) vector expression was evaluated in a subcutaneous mouse mammary cancer model of naive and preimmunized animals. BALB-C mice were injected subcutaneously with syngeneic TM40-D mouse mammary cancer cells (1×10^6 /50 μ l media). After 21 days of tumorigenesis, preimmunization was achieved by intratumoral injection of a gutless AdV vector (1×10^{11} v.p./tumor). Fourteen days later both naive and preimmunized groups of mice received an intratumoral injection of AdV bearing the luciferase reporter gene (AdV-Luc), at doses ranging from 2×10^9 to 2×10^{11} v.p./tumor. The levels of AdV-Luc expression in tumors and normal tissues as a function of time (days 2,7 and 14 after AdV-Luc injection) and AdV dose, were assessed with the Luciferase assay, and ELISA was used to quantitate AdV antibodies. Tissue histological changes and hepatic enzymes were used to evaluate normal tissue toxicity. Statistical analysis was conducted using Student's T-Test and Analysis of Variance.

Results: Preimmunization resulted in statistically significant lower luciferase expression in tumor (23-fold) and liver (800-fold). Preimmunized animals also demonstrated more pronounced decreases in liver luciferase expression by a minimum of 808-fold compared to tumor (minimum of 56-fold) at all time points. AdV antibody titers were higher in reimmunized animals at all time points and maximally increased one week after AdV-Luc injection in both groups. AdV dose related increases in intratumoral luciferase expression were observed only in preimmunized animals. Specifically, higher AdV doses, above 2×10^{10} v.p./tumor, increased intratumoral luciferase expression to levels comparable to those of naive animals. In liver, significant AdV dose related luciferase increase by 4000-fold was observed only for naive animals while preimmunization resulted in low levels of liver luciferase activity comparable to that of low dose naive group ($p > 0.424$). In contrast to naive animals, all preimmunized animals developed histologic evidence of grade 2-3 hepatic toxicity which was also reflected by increases in the average values of hepatic enzymes.

Conclusions: A preferential decrease in adenoviral vector expression is observed in liver compared to tumor after preimmunization. Higher adenoviral doses restore intratumoral adenoviral expression to levels comparable to those of naive animals. However, the hepatic toxicity observed in preimmunized animals need to be further assessed due to the therapeutic implications for the treatment of cancer with multiple courses of adenoviral-mediated gene therapy.

Keywords: Adenovirus, Gene Therapy, Preimmunization, Toxicity, Pre-existing immunity.



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor

ABSTRACT

Objective: Preimmunization to adenoviruses may influence the therapeutic effectiveness and toxicity of adenoviral-mediated gene therapy for cancer. This study was undertaken to evaluate the impact of intratumoral preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity.

Materials and Methods: The levels and duration of adenoviral (AdV) vector expression was evaluated in a subcutaneous mouse mammary cancer model of naive and preimmunized animals. BALB-C mice were injected subcutaneously with syngeneic TM40-D mouse mammary cancer cells (1×10^6 /50 μ l media). After 21 days of tumorigenesis, preimmunization was achieved by intratumoral injection of a gutless AdV vector (1×10^{11} v.p./tumor). Fourteen days later both naive and preimmunized groups of mice received an intratumoral injection of AdV bearing the luciferase reporter gene (AdV-Luc), at doses ranging from 2×10^9 to 2×10^{11} v.p./tumor. The levels of AdV-Luc expression in tumors and normal tissues as a function of time (days 2,7 and 14 after AdV-Luc injection) and AdV dose, were assessed with the Luciferase assay, and ELISA was used to quantitate AdV antibodies. Tissue histological changes and hepatic enzymes were used to evaluate normal tissue toxicity. Statistical analysis was conducted using Student's T -Test and Analysis of Variance.

Results: Preimmunization resulted in statistically significant lower luciferase expression in tumor (23-fold) and liver (800-fold). Preimmunized animals also demonstrated more pronounced decreases in liver luciferase expression by a minimum of 808-fold compared to tumor (minimum of 56-fold) at all time points. AdV antibody titers were higher in reimmunized animals at all time points and maximally increased one week after AdV-Luc injection in both groups. AdV dose related increases in intratumoral luciferase expression were observed only in preimmunized animals. Specifically, higher AdV doses, above 2×10^{10} v.p./tumor, increased intratumoral luciferase expression to levels comparable to those of naive animals. In liver, significant AdV dose related luciferase increase by 4000-fold was observed only for naive animals while preimmunization resulted in low levels of liver luciferase activity comparable to that of low dose naive group ($p > 0.424$). In contrast to naive animals, all preimmunized animals developed histologic evidence of grade 2-3 hepatic toxicity which was also reflected by increases in the average values of hepatic enzymes.

Conclusions: A preferential decrease in adenoviral vector expression is observed in liver compared to tumor after preimmunization. Higher adenoviral doses restore intratumoral adenoviral expression to levels comparable to those of naive animals. However, the hepatic toxicity observed in preimmunized animals need to be further assessed due to the therapeutic implications for the treatment of cancer with multiple courses of adenoviral-mediated gene therapy.

Keywords: Adenovirus, Gene Therapy, Preimmunization, Toxicity, Pre-existing immunity.

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Asesor

Dr. Estuardo Aguilar Córdova

Co-Asesor