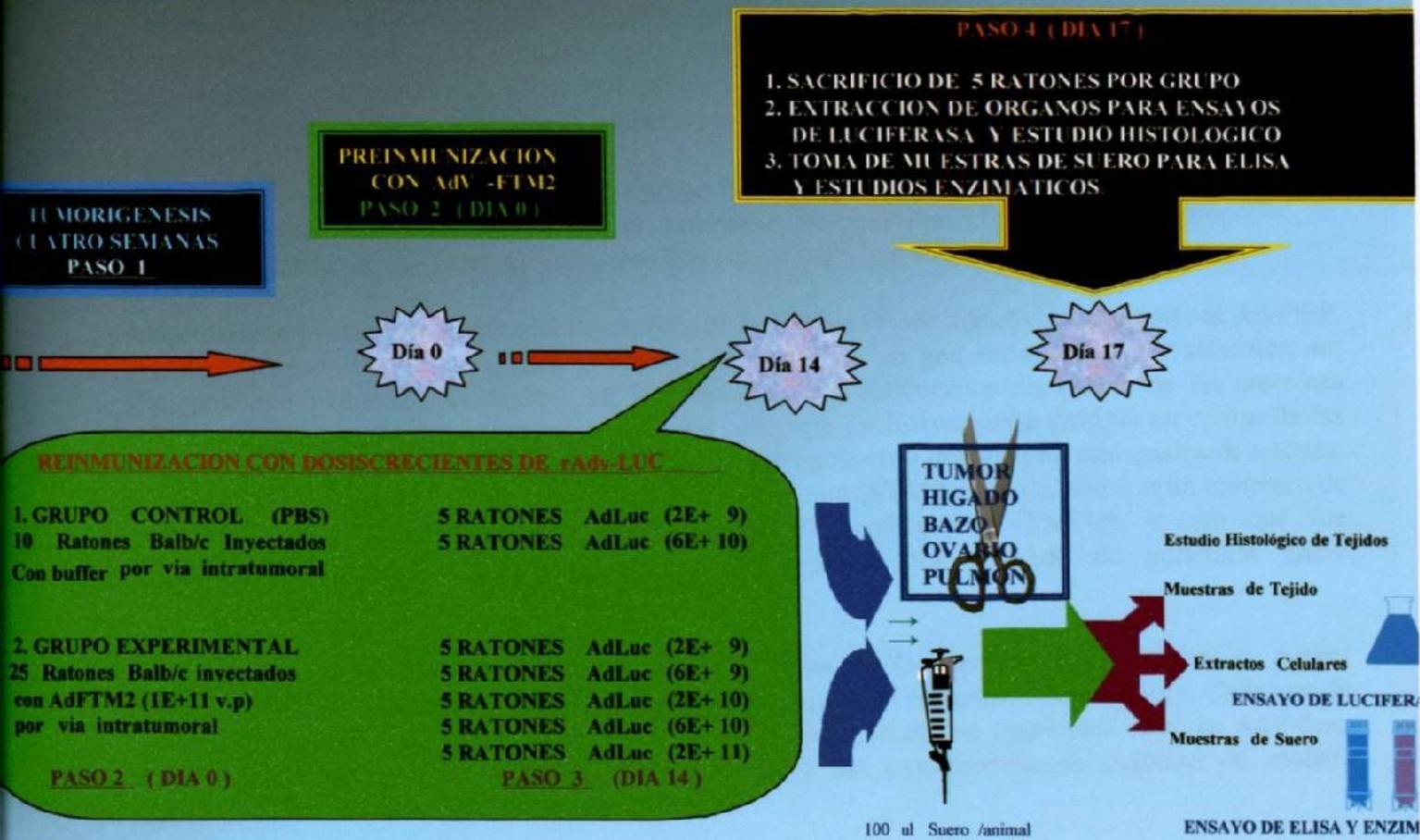


El diseño experimental de la segunda etapa de investigación es semejante al de la primera y sus aspectos generales están detallados en la **figura 17**. Para este experimento se utilizó una población de 35 ratones Balb/c los cuales fueron divididos en 7 diferentes grupos de 5 ratones cada uno. Durante el día 0 del experimento, cinco grupos de animales recibieron pre-inmunización con AdV-FTM2, mientras que dos grupos fueron inyectados con solución de amortiguador de fosfatos (PBS) para constituir los 2 grupos control. En el día 14, todos los animales pre-inmunizados fueron inyectados por vía intratumoral con dosis crecientes de AdV-Luc como se explica a continuación: grupo 1: 2×10^9 , grupo 2: 6×10^9 , grupo 3: 2×10^{10} , grupo 4: 6×10^{10} , grupo 5: 2×10^{11} , v.p./20 μ l/tumor. Del mismo modo, durante el día 14, a los 2 grupos de animales controles se les inyectó con AdV-Luc a una dosis de 2×10^9 , y 6×10^{10} v.p./20 μ l/tumor.

Dos días después de la re-inmunización (día 16) todos los animales fueron sacrificados y se procedió a recolectar muestras de cada uno de los tejidos en estudio (hígado, bazo, tumor, ovario y pulmón) para realizar los respectivos ensayos de luciferasa y estudios histológicos. Simultáneamente, se tomaron muestras de suero para realizar el ensayo de ELISA y los estudios enzimáticos. Finalmente, los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA oneway).

Fig. 17. ESTRATEGIA GENERAL DE LA FASE II (SEGUNDA ETAPA) DIRIGIDA A EVALUAR SI LA PRE-INMUNIZACION PERMITE EL USO DE DOSIS PROGRESIVAS DE ADENOVIRUS SIN LA APARICION DE HEPATO-TOXICIDAD



7.2.13 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA TERCERA ETAPA: Dirigida al Desarrollo de Esquemas para Disminuir la Inmunogenicidad de los Vectores Adenovirales.

Recientemente, se ha desarrollado un novedoso método para conjugar polímeros de polietilen-glicol (PEG) con las proteínas de la cápsida de los adenovirus. Esta técnica se denomina PEGilación y ha sido empleada con anterioridad en la industria farmacéutica para resguardar las proteínas y enzimas de la degradación metabólica y protegerlas de los efectos de la inmunidad¹⁰. En este trabajo utilizamos vectores adenovirales conjugados con tresilato de monometoxi-polietilen-glicol (TMPG), con el propósito de caracterizar la respuesta humoral en contra de adenovirus; así como establecer si la PEGilación del vector se traduce en una mejor y persistente expresión del transgen.

Para la producción de los conjugados virales se utilizaron adenovirus tipo 5, de primera generación que expresan las secuencias para proteína verde fluorescente y luciferasa bajo el control del promotor CMV. Asimismo, se utilizó un adenovirus carente de secuencias reporteras "gutless" (Adv-5 FT2M59). Todos los vectores fueron amplificados en células 293 utilizando el método ya conocido,²⁸ luego las partículas virales fueron purificadas a partir de los lisados celulares por medio de centrifugación diferencial en gradientes de cloruro de cesio. Alícuotas de cada vector fueron desaladas en una solución 10 mM de amortiguador fosfato-potasio (pH 7.4). Las concentraciones virales fueron determinadas por espectrofotometría UV a 260 nm, y corresponden a 9.02×10^{12} , 1.86×10^{13} , 8.87×10^{12} , V.P/ml para AdV-Luc, AdV-GFP y AdV-FT2M59 respectivamente.

Durante el procedimiento de PEGilación se utilizó un gramo de tresil-MPEG (TMPEG) obtenido de sigma chemical co. (st. louis, mo.), el cual fue diluido en 5 ml de "GVL tris Buffer" (pH 8). La reacción de conjugación se realizó durante un período de 30 minutos a 25°C de temperatura, utilizando una concentración de partículas virales equivalente a 1×10^{11} v.p resuspendidas (volumen a volumen) en TMPG y utilizando un aparato de rotación lenta. La reacción fue detenida por medio de la adición de 10X L-lisina y posterior disminución de la temperatura a 4°C.

Durante esta etapa del estudio se utilizó otro grupo de animales (n = 60) preinmunizados, pero ahora utilizando un vector adenoviral recubierto con polímeros de polietilen glicol. Para este propósito, se repitió el experimento inicial, pero se incluyeron dos importantes variables:

Primera: durante la etapa de preinmunización (día 0) se usó un vector adenoviral diferente al Ad-GFP. Este vector se denomina "gutless" AdFTM2, ya que carece de un gen reportero y por añadidura no expresa proteínas exógenas, evitándose así la producción de anticuerpos en contra de las proteínas reporteras, y garantizando que la respuesta humoral estuviese exclusivamente dirigida en contra de las proteínas virales. Segunda: durante la preinmunización se incluyeron dos grupos adicionales de ratones: Uno que recibió una inyección intratumoral con el adenovirus AdFTM2 encapsulado con un polímero de PEG biológicamente activado (Tresylmonomethoxypolyethylene glycol -TMPG), y otro que fue inoculado con el adenovirus encapsulado con un polímero no activado de polietilen glicol (Monomethoxypolyethylene glycol -MPG).

Dos semanas más tarde los ratones fueron reinmunizados de la manera citada durante el primer experimento, pero ahora cada uno de los grupos fue subdividido en subgrupos de 4 ratones. Cada uno de los diferentes subgrupos fue entonces reinmunizado con solo uno de los siguientes vectores AdV-Luc, Ad/Luc+TMPG, AdV-GFP o Ad/GFP+TMPG. El resto del experimento se culminó de manera semejante al experimento inicial. Ver la **Figura 18**.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros

Para investigar los efectos de la inmunidad humoral contra adenovirus en un modelo murino, se inocularon 45 animales por células de cáncer de mama. Después de un periodo de 3 semanas de inmunogenicidad, se inmunizó (Día 0) a los ratones un control negativo a propósito de un vector

REINMUNIZACION CON AD-VECTOR
PORTADOR DE GFP o LUCIFERASA +
TMPG POR VIA INTRA-TUMORAL
Y TOMA DE MUESTRAS DE SUERO
PASO 2 (DIA 14)

1. SACRIFICIO DEL TOTAL DE RATONES (n=60)
2. EXTRACCION DE ORGANOS PARA ENSAYOS
DE LUCIFERASA E INMUNOFLORESCENCIA
3. TOMA DE MUESTRAS DE SUERO PARA ELISA
PASO 3 DIA 16

PRE-INMUNIZACION
CON AdFTM2+TMPG
PASO 1 (DIA 0)

DIA 0

DIA 14

16-17

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13.

DIA 0 (PASO 1)

GRUPO: A (CONTROL)

16 Balb/c inoculados con PBS por via IT

GRUPO: B (INTRA-TUMORAL)

16 Balb/c inoculados con AdFTM2

GRUPO: C (SUBCUTANEO)

8 Balb/c inoculados con AdFTM2

GRUPO: D (Ad-ENCAPSULADO)

16 Balb/c inoculados con AdFTM2

+ TMPEG POR VIA I-TUMORAL

GRUPO: E

4 Balb/c inoculados con AdFTM2+MPG

DIA 14 (PASO 2)

4 Ratones Ad-Luc

4 Ratones Ad-GFP

4 Ratones Ad-Luc + TMPG

4 Ratones Ad-GFP + TMPG

4 Ratones Ad-Luc

4 Ratones Ad-GFP

4 Ratones Ad-Luc + TMPG

4 Ratones Ad-GFP + TMPG

4 Ratones Ad-Luc

4 Ratones Ad-GFP

4 Ratones Ad-Luc + TMPG

4 Ratones Ad-GFP + TMPG

4 Ratones Ad-Luc + TMPG



Sacrificio de:
n = 60 animals

TUMOR
HIGADO
BAZO
OVARIO



50 ml Suero/Animal



ESTUDIO DE INMUNOFLORESCENCIA

Muestras de Tejido

Extractos Celulares

ENSAYO DE LUCIFERASA

Muestras de Suero

ELISA Y ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Figura 18. Estrategia general de la tercera etapa de investigación. Representación esquemática del método experimental dirigido a disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de la encapsulación de la cápside (PEGilación) con Polímeros de Polietilenglicol.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros

Para investigar los efectos de la inmunidad humoral contra adenovirus en un modelo murino, se inocularon 45 animales con células de cáncer de mama. Después de un período de 3 semanas de tumorigénesis, se inmunizó (día 0) a los ratones en estudio mediante la inyección de un vector adenoviral. Estableciéndose 3 grupos de estudio: A)- 15 ratonas fueron inyectadas por vía intratumoral. B)- 15 animales fueron inoculados por vía subcutánea y, C)- El grupo control quedó constituido por 15 animales inyectados por vía subcutánea con buffer de fosfatos (PBS). Adicionalmente, se inyectaron 5 ratones inmunodeficientes RAG-2, los cuales fueron utilizados como segundos controles, ya que aunque recibieron la inyección de adenovirus, no tienen capacidad de generar anticuerpos.

Dos semanas después (día 14) de la inmunización todos los animales fueron re-inmunizados por medio de la inyección intratumoral de un segundo vector adenoviral portador del gen reportero que codifica para la enzima luciferasa, con la finalidad de monitorear los niveles de expresión de la proteína reportera dentro del tumor, así como la diseminación del vector a otros órganos.

Durante los días 16, 21 y 28 se sacrificaron 5 animales de cada uno de los grupos y se practicó disección y extracción quirúrgica del hígado, bazo, ovarios y tumor de cada uno de los animales con la finalidad de realizar los ensayos de luciferasa e inmunofluorescencia. Asimismo, las muestras de suero correspondientes a los días 0, 14, 16, 21 y 28 del experimento fueron analizadas para determinar la cantidad de anticuerpos específicos en contra de adenovirus, por medio de los ensayos de ELISA y de neutralización.

Se analizaron los datos obtenidos entre los grupos de animales inmunizados por vía subcutánea e intratumoral y se compararon con aquellos obtenidos en los animales testigos. En los dos grupos de animales preinmunizados, la producción de anticuerpos en contra de adenovirus fue elevada y persistente, aunque declinó lentamente a lo largo del tiempo.

Con respecto a los animales controles inoculados con solución salina, la producción de anticuerpos fue nula durante los días 14 y 16, siendo similar a la exhibida por los ratones antes del tratamiento y a la de los ratones inmunodeficientes.

Los aspectos cinéticos de la producción de anticuerpos revelan que el incremento en los títulos es una función dependiente del tiempo. Se observó una sobreproducción de anticuerpos después de 7 días de la primera inmunización y los títulos permanecieron elevados durante la semana siguiente. Después de la reinmunización con el segundo vector (día 14), se observó un mayor incremento en la producción de anticuerpos hacia el día 21. Finalmente, la actividad humoral comenzó a disminuir hacia el día 28, o sea a las 4 y 2 semanas después de la inmunización y reinmunización, respectivamente. Ver la **Tabla 1** y **Figura 19**.

Tabla. 1 TITULACIÓN DE ANTICUERPOS EN CONTRA DE rAdv-5 POR ELISA

| Grupo: | Título ($\log_2/50\mu\text{l}$) | | | | | Media | Desv. Std. |
|---------------|-----------------------------------|----|----|----|----|-------|------------|
| | A | B | C | D | E | | |
| Pre-Tx | <3 | <3 | | | | <3 | 0 |
| Control D-14 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | 0.00 |
| Intratum.D-14 | 5 | 4 | 7 | 5 | 5 | 5.2 | 1.10 |
| Subcut. D-14 | 3 | 4 | 7 | 5 | 4 | 4.6 | 1.52 |
| RAG-2 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | 0.00 |
| Control D-16 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | 0.00 |
| Intratum.D-16 | 8 | 8 | 8 | 5 | 3 | 6.4 | 2.30 |
| Subcut. D-16 | 4 | 8 | 8 | 8 | 8 | 7.2 | 1.79 |
| Control D-21 | 7 | 7 | 7 | 4 | 8 | 6.6 | 1.52 |
| Intratum.D-21 | 8 | 11 | 10 | 9 | 10 | 9.6 | 1.14 |
| Subcut. D-21 | 10 | 10 | 9 | 9 | 10 | 9.6 | 0.55 |
| Control D-28 | 4 | 4 | 5 | 6 | 6 | 5 | 1.00 |
| Intratum.D-28 | 8 | 11 | | | | 9.5 | 2.12 |
| Subcut. D-28 | 7 | 8 | 8 | 7 | | 7.5 | 0.58 |

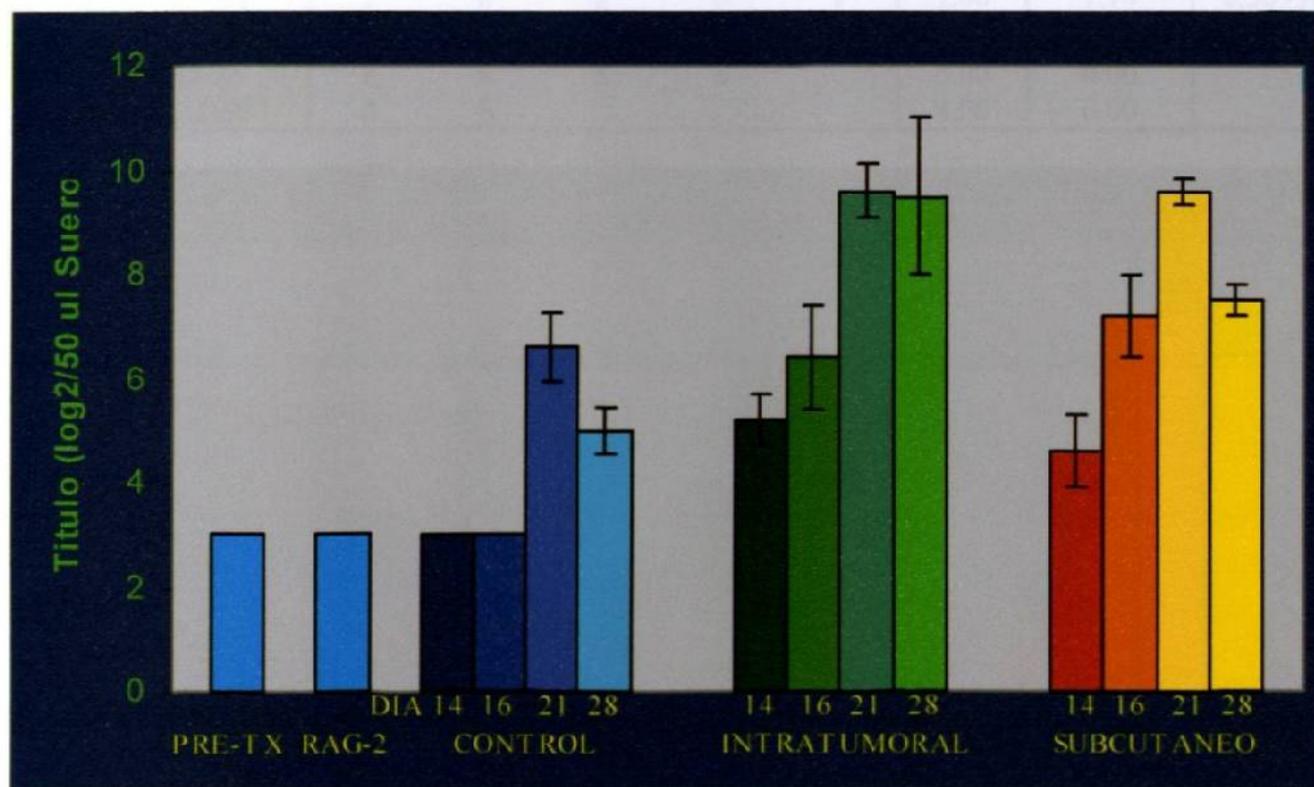


Figura 19. Gráfico de los títulos de anticuerpos contra rAdv-5 por ELISA. Nótese, que en los animales controles la producción de anticuerpos se eleva una semana después de la inyección inicial del vector. En los grupos de animales pre-inmunizados se aprecia una elevación en los títulos de anticuerpos muy similar entre las dos vías de inmunización.

Los resultados del ensayo de neutralización son similares a los del ensayo de ELISA, ya que también se observó un primer pico de elevación de anticuerpos, una semana después de la primoinfección del grupo de animales controles. En los animales preinmunizados, se observó un segundo incremento en la neutralización después de 7 días de haberse inyectado el segundo vector. Ver la **Tabla 2** y **Figura 20**.

Tabla 2. TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN CONTRA DE rAdv-5

| Grupo | Titulo
(log ₂ /50ul) | | | | | Media | Std. Dev | SQRT |
|-----------------|------------------------------------|---|---|---|----|-------|----------|----------|
| | A | B | C | D | E | | | |
| Pre-Tratamiento | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0.00 | 0.00 | 0 |
| Control D-14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0 |
| Subcut. D-14 | 4 | 4 | 5 | 2 | 3 | 3.60 | 1.14 | 0.509902 |
| Intratum.D-14 | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4.00 | 0.71 | 0.316228 |
| Control D-16 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1.00 | 0.00 | 0 |
| Subcut. D-16 | 7 | 7 | 6 | 7 | | 6.75 | 0.50 | 0.223607 |
| Intratum.D-16 | 5 | 6 | 6 | 6 | | 5.75 | 0.50 | 0.223607 |
| Control D-21 | 5 | 4 | 5 | 6 | 6 | 5.20 | 0.84 | 0.374166 |
| Subcut. D-21 | 9 | 8 | 8 | 9 | 10 | 8.80 | 0.84 | 0.374166 |
| Intratum.D-21 | 7 | 8 | 8 | 6 | 9 | 7.60 | 1.14 | 0.509902 |
| Control D-28 | 4 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5.00 | 0.71 | 0.316228 |
| Subcut. D-28 | 8 | 8 | 8 | 8 | | 8.00 | 0.00 | 0 |
| Intratum.D-28 | 8 | 8 | | | | 8.00 | 0.00 | 0 |

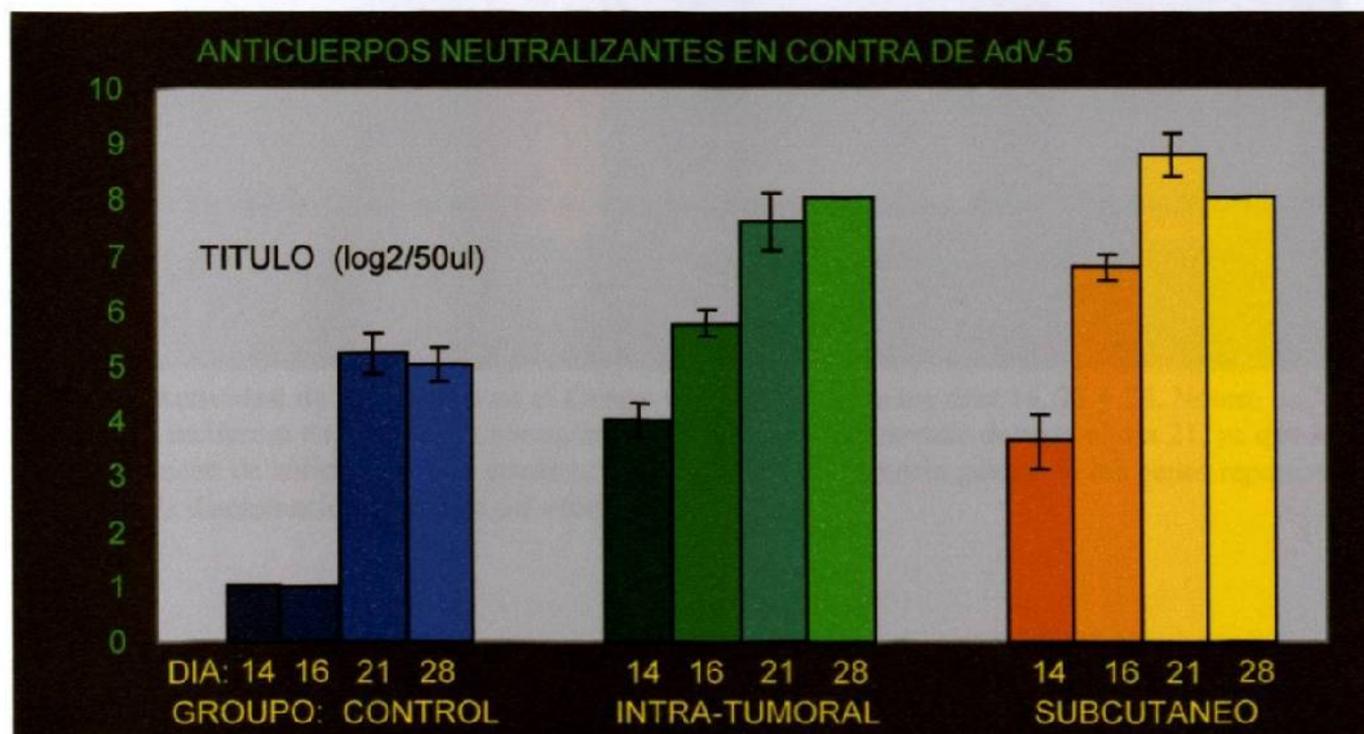


Figura 20. Gráfico de la actividad de neutralización de Adv-5. El título de neutralización se visualiza como un marcador subrogado de la habilidad del anticuerpo para prevenir la infección *in vivo*.

Los resultados del ensayo de luciferasa obtenidos para el grupo control son ilustrados en la **figura 21**. El análisis de los mismos demuestra que durante el día 16 el grupo de animales controles (sin inmunidad pre-existente), exhibe una actividad de luciferasa extremadamente elevada en cada uno de los órganos examinados -hígado, bazo, tumor y ovario-. Dicha elevación es más acentuada en el hígado y dentro del parénquima tumoral ($3.00E+8$) que las observadas en el bazo y el ovario ($2.00E+8$ y $1.00E+8$ respectivamente).

Por otro lado, en el grupo control, se no observaron diferencias significativas cuando se comparó la

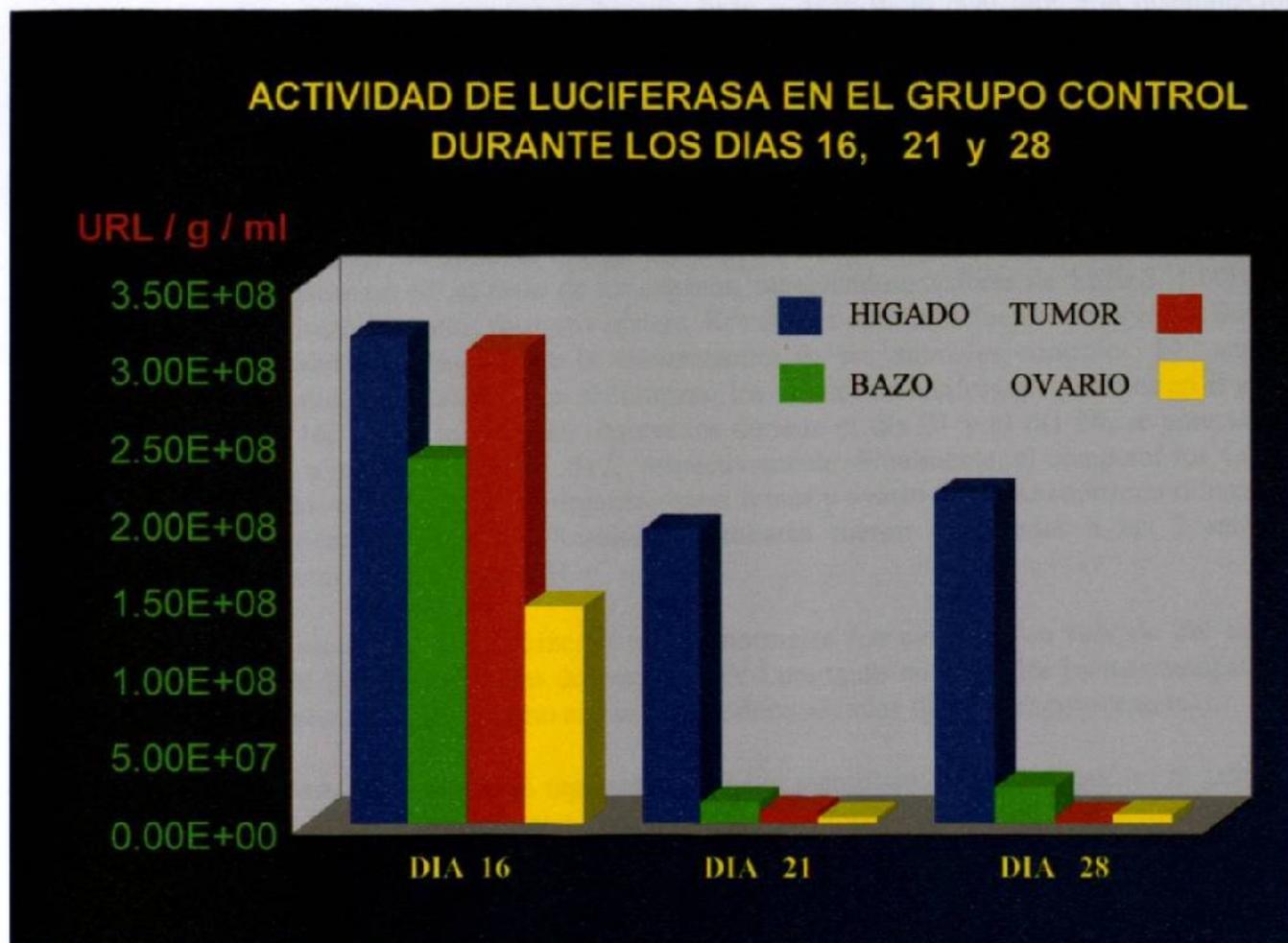


Figura 21. Actividad de Luciferasa en el Grupo Control durante los días 16, 21 y 28. Nótese que la actividad de luciferasa en los ratones normales es extremadamente elevada durante el día 21, ya que los animales carecen de anticuerpos que puedan obstaculizar la transferencia génica de los genes reporteros y/o impedir la diseminación sistémica del vector.

Los resultados del ensayo de luciferasa obtenidos para el grupo control son ilustrados en la figura 21. El análisis de los mismos demuestra que durante el día 16 el grupo de animales controles (sin inmunidad pre-existente), exhibe una actividad de luciferasa extremadamente elevada en cada uno de los órganos examinados -hígado, bazo, tumor y ovario-. Dicha elevación es más acentuada en el hígado y dentro del parénquima tumoral ($3.00E+8$) que las observadas en el bazo y el ovario ($2.00E+8$ y $1.00E+8$ respectivamente).

Dos días después de la inyección intratumoral del vector AdV-Luc a una dosis de 1×10^{11} v.p. /tumor, el promedio de actividad de luciferasa dentro del tumor de los animales controles fue 23 veces más alto (23 X) comparado con los ratones pre-inmunizados (3.07×10^8 RLU/gm y 1.3×10^7 , respectivamente, $p=0.004$). De la misma manera, la expresión de luciferasa en el total de tejidos examinados fue significativamente más elevada en el grupo control en comparación con los animales con inmunidad pre-existente: 808 X para el hígado, 2,392 X para el bazo y 714 X para los ovarios.

Por otro lado, 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. Sin embargo, en los grupos de animales pre-inmunizados, la expresión de AdV-Luc, inyectado intratumoralmente, a nivel del propio tumor fue significativamente mayor comparada con la observada en el hígado (33 X,), bazo (131 X,) y ovario (55 X,). Ver las Figuras 21, 22 y 23.

Una semana después de que el grupo de animales controles recibió la primera inyección con adenovirus (día 21), se presentó una notoria disminución en los niveles de expresión de la proteína reportera dentro del tejido tumoral (7.00×10^6). No obstante que la disminución de luciferasa fue más importante dentro del tumor, también se presentó en el resto de los órganos, obteniéndose valores de 1.8×10^8 , 1.00×10^7 y 3.00×10^6 , para hígado, bazo y ovario, respectivamente. Resultados similares fueron observados durante el día 28 o sea, dos semanas después de la inmunización de los animales controles. El análisis estadístico de estos resultados demuestra que al comparar los valores de luciferasa existentes en el grupo control durante el día 16, contra los valores observados durante el día 21 y el día 28, se aprecia una diferencia significativa a nivel del .014 y .017, respectivamente. Finalmente, al comparar los valores de luciferasa encontrados en el resto de los órganos -bazo, tumor y ovario- no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>.689$). Resultados similares fueron observados a las 2 semanas después de la IT del vector. Ver la Figura 21

La expresión de luciferasa dentro del tumor y tejidos normales fue evaluada en función del tiempo transcurrido después de la administración del vector AdV-Luc, tanto en animales inmunocompetentes pero no inmunizados (control salino), como en ratones pre-inmunizados (grupos experimentales).

La expresión intratumoral de la proteína reportera (Luc) fue significativamente mayor en el grupo de ratones control que en los experimentales, en todos los tiempos del estudio. Específicamente, la preinmunización provocó una notoria disminución en la expresión intratumoral de AdV-Luc a los 2 días después de iniciada la reinmunización (55 X). En todos los grupos de estudio la expresión de luciferasa fue significativamente mayor durante el día 2 después de la administración de AdV-Luc. Contrariamente, durante los días 7 y 14 se observó una significativa disminución de 54 veces y 53 veces para el grupo control y de 52 X y 337 X para el grupo de animales preinmunizados, respectivamente. Ver la Figura 23.

En los ratones controles la expresión de AdV-Luc dentro del hígado presentó mínimos cambios en el transcurso del tiempo (Fig. 21). Inversamente, en los grupos de animales preinmunizados se observó una significativa disminución en la actividad de la enzima al compararla con los animales controles 808 X durante el día 2 y por arriba de 10,000 X durante los días 7 y 14. Estos resultados se tradujeron en un significativo incremento del cociente tumor/hígado de los títulos de la actividad de luciferasa, en los animales preinmunizados en comparación con los animales controles en todos los tiempos.

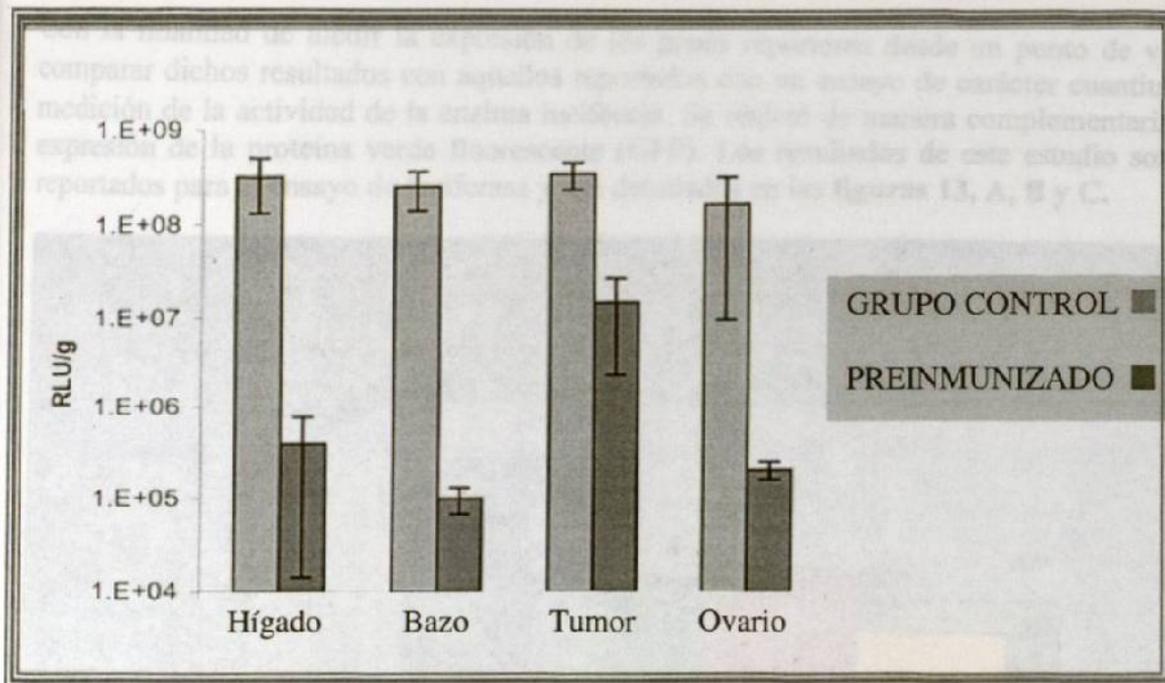


Figura 22. Actividad de luciferasa en ratones controles y preimmunizados expresada en RLU/g de tejido. Nótese su importante disminución dentro del tumor y en todos los órganos de los animales preimmunizados. Particularmente, la preimmunización limita la expresión de luciferasa en los tejidos Normales de 714-2392 veces ($P=0.001$), mientras que a nivel tumoral disminuyeron solo 23 veces ($p=0.004$).

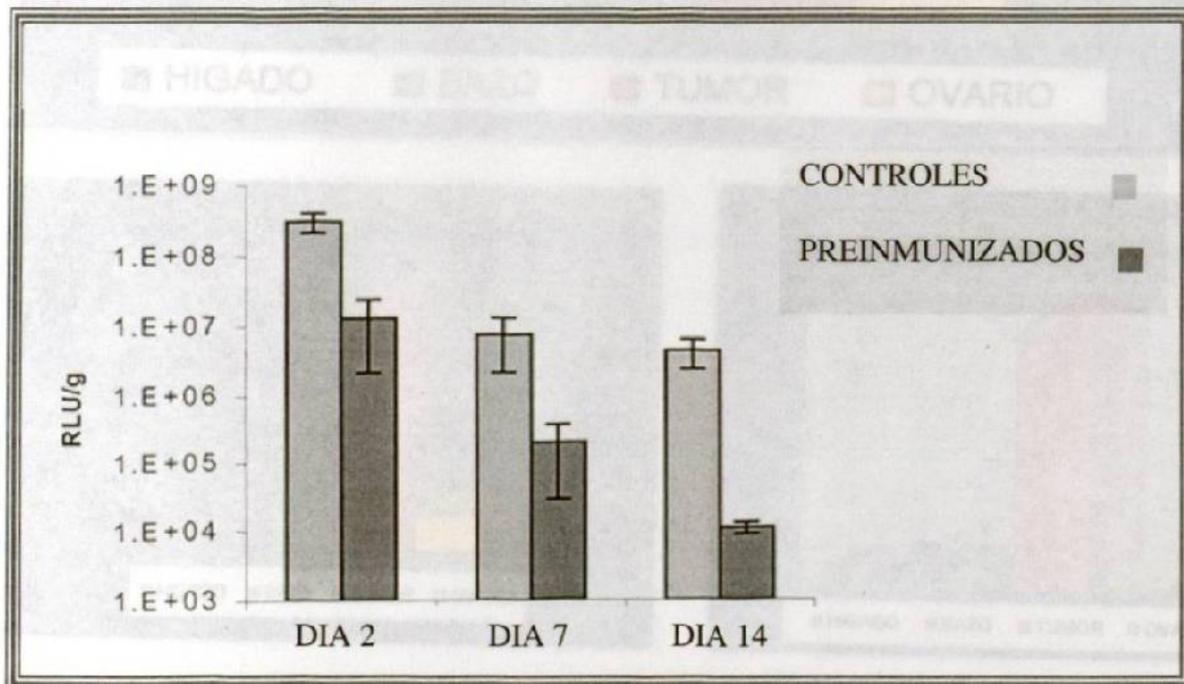
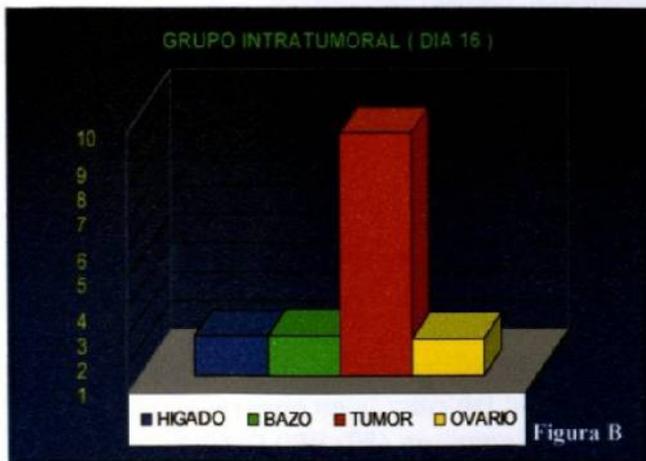
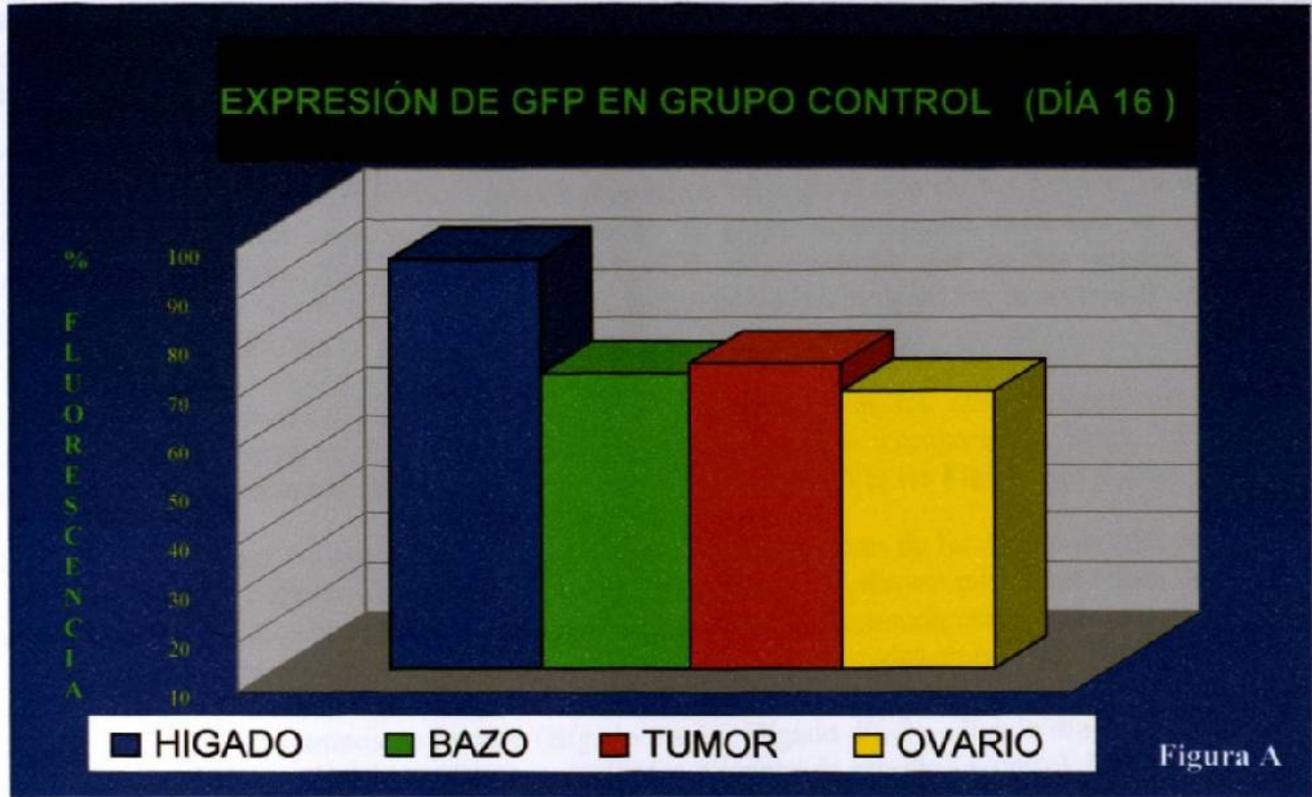


Figura 23. Expresión Intratumoral de Adv-Luc en Ratones Controles y Preimmunizados. Muestra como los niveles de luciferasa intratumoral se incrementan en el día 2 después de la inmunización y disminuyen durante el día 7 en ambos grupos. En controles, la Luc. I.T esta consistentemente elevada en todos los tiempos ($p=0.004$).

Con la finalidad de medir la expresión de los genes reporteros desde un punto de vista cualitativo y comparar dichos resultados con aquellos reportados con un ensayo de carácter cuantitativo, como es la medición de la actividad de la enzima luciferasa. Se realizó de manera complementaria el ensayo de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Los resultados de este estudio son similares a los reportados para el ensayo de luciferasa y son detallados en las figuras 13, A, B y C.



Figuras A, B y C. Resultados del ensayo cualitativo de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) durante el día 16, en los tres grupos de estudio. Se observa una significativa reducción en el nivel de expresión de GFP en los grupos de animales preinmunizados. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor.

El análisis estadístico de los resultados del ensayo de luciferasa entre los diferentes grupos demostró que en el grupo control la actividad de la proteína reportera se encuentra notablemente aumentada durante el día 16 y disminuye durante la primera y segunda semana (días 21 y 28) después de la inmunización ($p=.014$ y $.017$ respectivamente).

La aplicación del mismo procedimiento estadístico (oneway ANOVA) en los grupos IT y SQ no demostró diferencias significativas ($p>.230$), lo cual demuestra que en los animales con inmunidad preexistente existe una homogénea y significativa disminución en la actividad total de luciferasa, y que dicha disminución es similar entre los 2 grupos de animales inmunizados. Ver la **Figura 24**

Cuando se agruparon los promedios de actividad de luciferasa en cada tejido, reportados durante los 3 tiempos de estudio y se compararon dichos promedios entre cada uno de los grupos, se observó que durante el día 16 del experimento solamente en el grupo de animales controles se observa un incremento en la expresión de luciferasa ($M=2.E+08$), mientras que en los grupos de ratones preinmunizados por vía IT y SQ se aprecia un significativo decremento en la actividad de la enzima ($M=3.E+06$ y $M=7.E+06$).

La comparación de estos promedios entre el grupo control con los otros grupos, demuestra una diferencia significativa a nivel del (0.000). Mientras que la comparación entre los 2 grupos experimentales no demostró diferencias significativas ($p=0.909$). Ver las **Figuras 24 y 25**.

Durante la parte final del análisis estadístico se agruparon los valores de luciferasa de cada animal en 12 grupos diferentes en donde cada grupo contiene los valores de luciferasa para cada tejido durante los 3 tiempos de estudio. Los promedios de actividad de luciferasa correspondientes a cada uno de los órganos en cada uno de los días de tratamiento fueron entonces comparados entre los diferentes grupos de estudio. De esta forma, la variable dependiente quedó constituida por cada uno de los tejidos en cada uno de los diferentes tiempos de estudio (Hígado día 16, Hígado día 21, Hígado día 28 ...etc), mientras que la variable independiente quedó integrada por los 3 grupos de estudio (Control, IT y SQ).

Los resultados de este tipo de estudio demuestran que durante el día 16 el hígado de los animales controles mostró la más importante elevación en la expresión de Luc. ($M= 3.15E+08$), mientras que en los grupos IT y SQ los valores disminuyeron ($M=389709$ y 72598 respectivamente). Dichas diferencias fueron significativas para una $p= 0.033$. Alternativamente, la comparación entre los grupos de animales preinmunizados no demostró diferencias significativas ($p=0.998$). El mismo procedimiento estadístico practicado en los hígados del día 21 y 28, evidenció resultados similares.

De la misma manera, el análisis estadístico practicado en el bazo exhibió resultados semejantes a los reportados en el hígado para cada uno de los tiempos de estudio.

El estudio de la actividad de luciferasa dentro del tumor en el día 16 demuestra un comportamiento semejante al observado en el caso del hígado, ya que se observó una mayor actividad de la enzima en el grupo control ($M=3.07E+08$) en comparación con los grupos IT y SQ ($M=1.2E+07$ y $2.8E+07$). Estas diferencias fueron significativas para una $p=0.004$. Por otro lado, la comparación entre los grupos de ratones preinmunizados no mostró diferencias significativas ($p=0.848$).

La actividad de luciferasa dentro del tumor durante los días 21 y 28 se observó notablemente disminuida en todos los grupos, sin embargo no se apreciaron diferencias significativas al comparar los promedios de luciferasa IT entre cada uno de los grupos ($p>0.122$ en el día 21 y de 0.061 en el día 28).

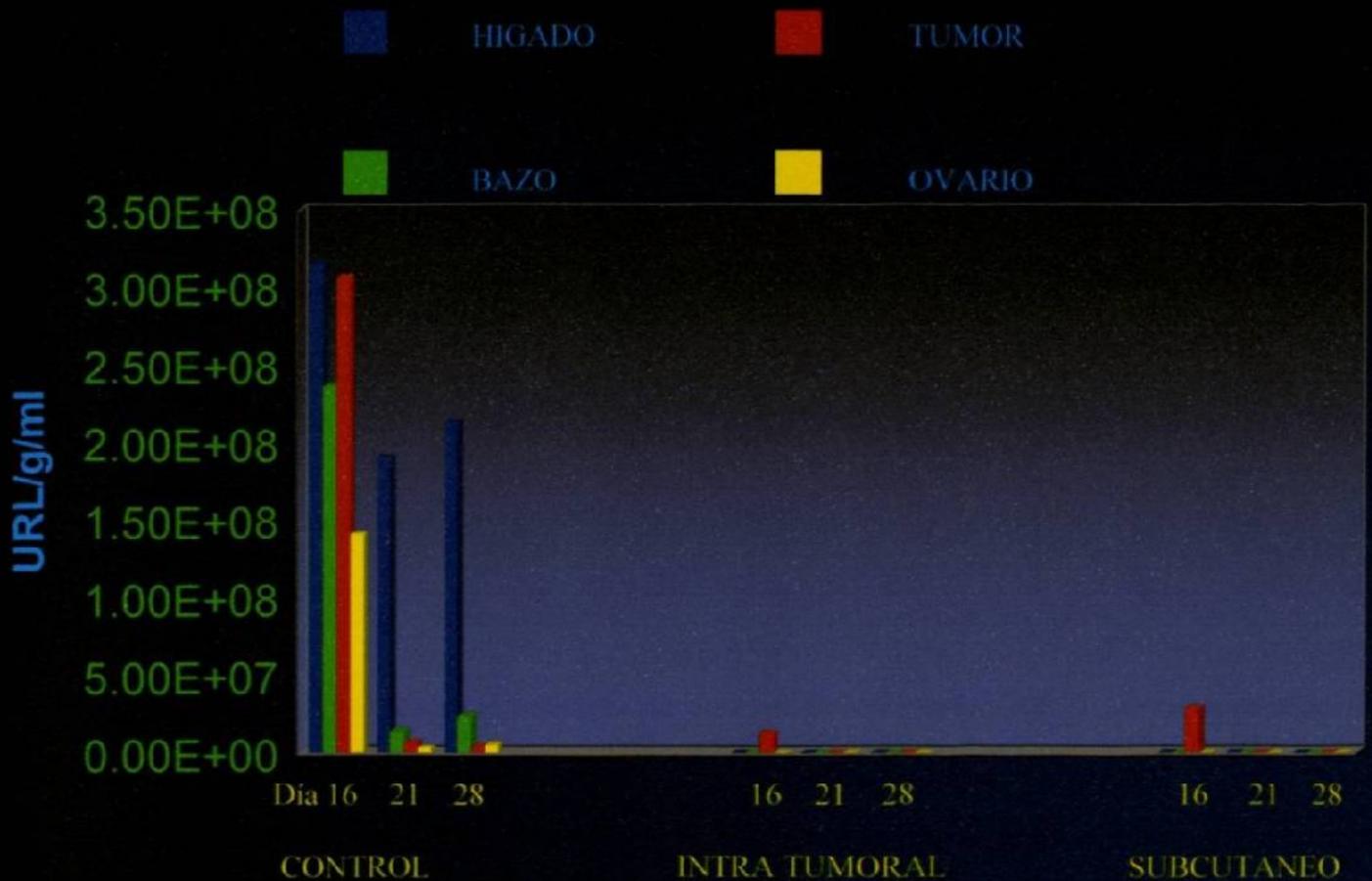


Figura. 24 Actividad de luciferasa en los tres grupos de estudio durante los días 16, 21, y 28. En el grupo de animales control se observa un incremento significativo en los promedios de expresión de Adv-Luc durante todos los tiempos de estudio. En el grupo de animales preinmunizados se aprecia una significativa disminución en la actividad de luciferasa, dicha disminución es similar entre ambas rutas de inmunización (Intratumoral y Subcutánea).

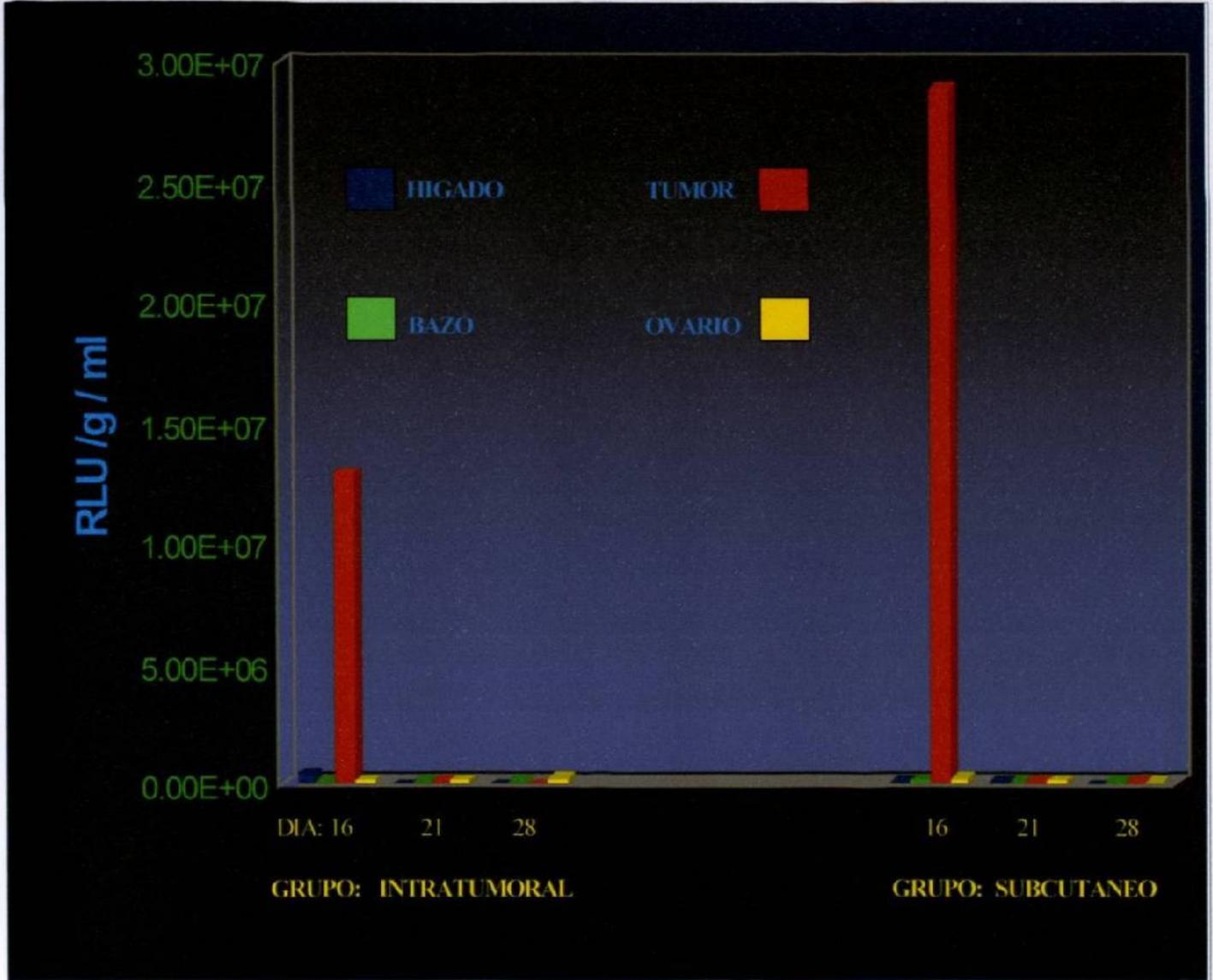


Figura 25. Actividad de luciferasa en los grupos inmunizados por vía subcutánea e intratumoral durante los Días 16, 21 y 28. En animales pre-inmunizados se observa una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor, lo cual sugiere la instalación de una respuesta inmune de tipo celular en contra de los hepatocitos infectados con Adv-Luc.

8.2 Investigación de los Efectos de la Inyección Intratumoral de Dosis Crecientes de Adenovirus en Ratones Normales y Preinmunizados.

La expresión de luciferasa fue evaluada como una función de la dosis de AdV-Luc administrada. La cuantificación de la actividad enzimática se efectuó a los dos días después de la administración del vector. En los animales controles se observó que al incrementar el rango de dosis de 2×10^9 a 6×10^{10} v.p./tumor se produce un significativo incremento de 4000 X en los niveles de expresión de Adv-Luc en el hígado. Paradójicamente, la actividad de luciferasa dentro del tumor presentó un pequeño incremento que no reportó diferencias significativas. Ver la **Figura 26**

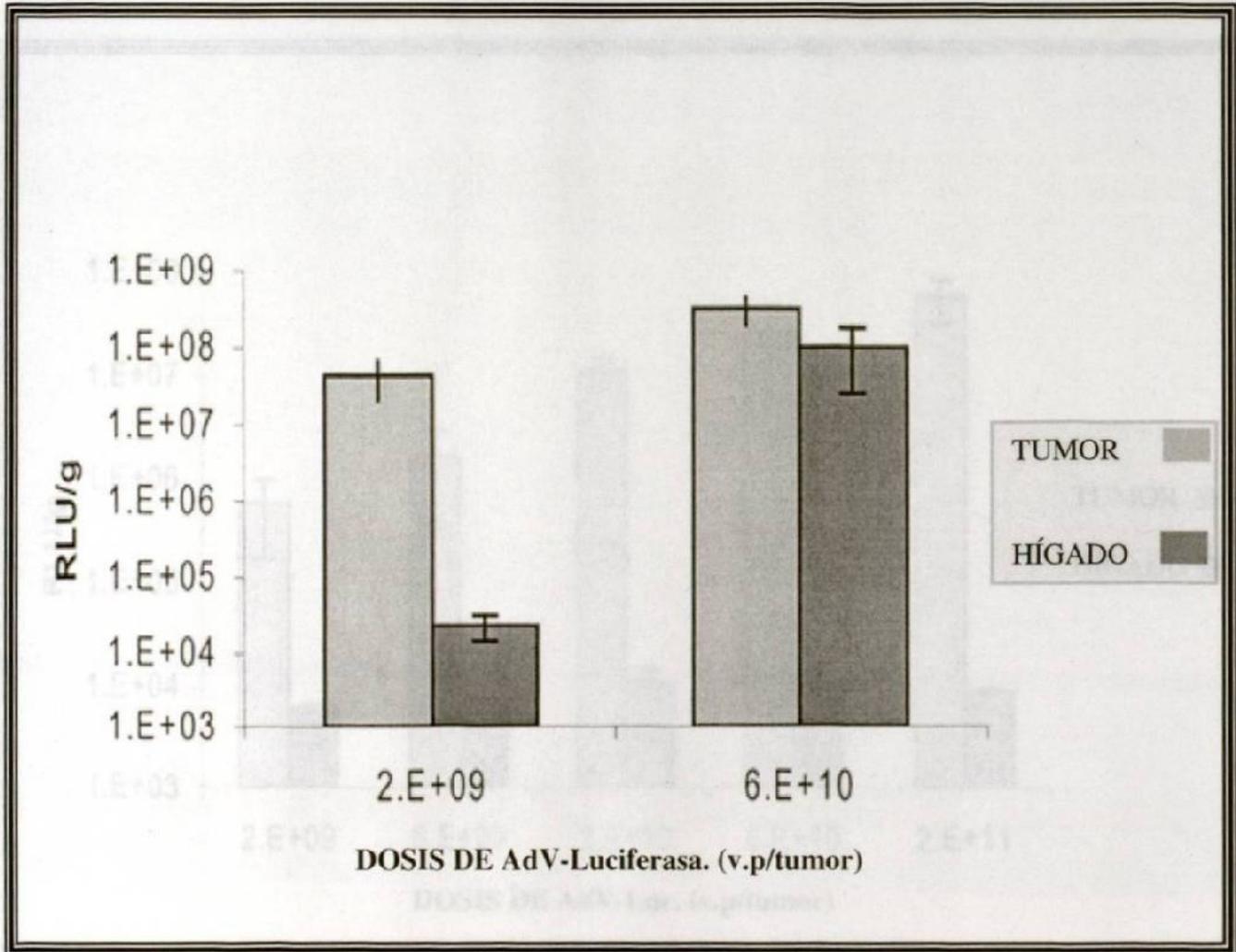


Figura 26. Expresión de Adv-Luc en animales control como una función de la dosis de adenovirus. En animales control se aprecia un incremento de 4000 X en la expresión de luciferasa hepática, cuando se incrementa la dosis de 2×10^9 to 6×10^{10} v.p./tumor ($p=0.000$), mientras que la expresión de Adv-Luc a nivel tumoral muestra un pequeño incremento no significativo ($p=0.112$).

En los animales pre-inmunizados la expresión de luciferasa fue evaluada en cada uno de los grupos inoculados con las siguientes dosis de adenovirus: 2×10^9 , 6×10^9 , 2×10^{10} , 6×10^{10} , 2×10^{11} , v.p./ $20 \mu\text{l}$ /tumor. El análisis estadístico de los resultados demostró una significativa disminución en la expresión intratumoral de AdV/Luc en los 2 primeros grupos, los cuales recibieron las dosis más bajas (2×10^9 , 6×10^9). Al comparar estos resultados con los niveles de expresión reportados en los grupos que recibieron las dosificaciones más altas (2×10^{10} , 6×10^{10} , 2×10^{11}), se puede observar un incremento 30 veces mayor en la actividad de luciferasa en estos últimos grupos ($p < 0.042$). Notablemente, la expresión intratumoral de luciferasa en los 3 grupos de más alta dosificación fue comparable con aquella observada en los animales controles ($p > 0.9$). Ver la **Figura 27**

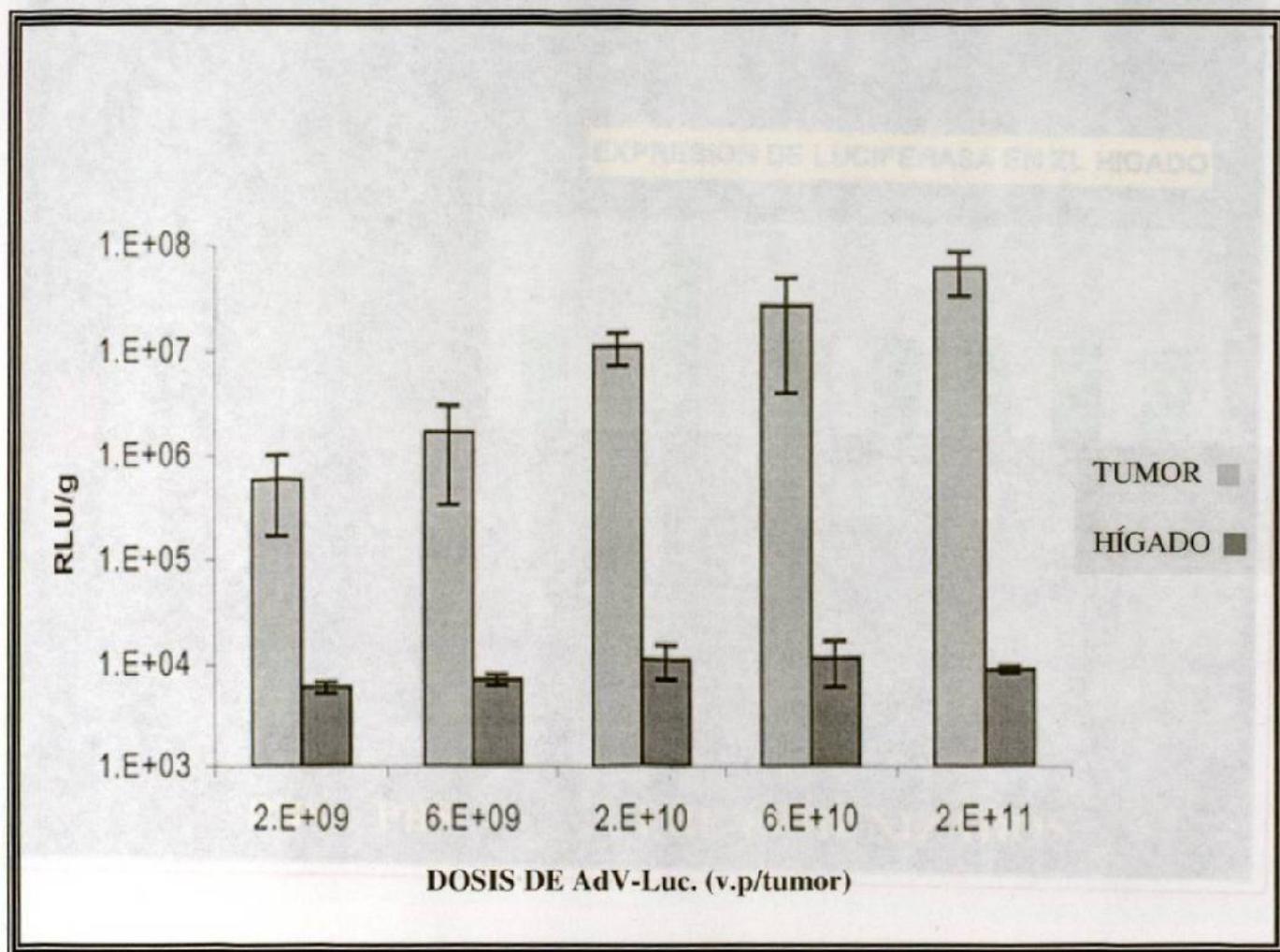


Figura 27. Expresión de Adv-Luciferasa en animales pre-inmunizados como una función dependiente de la dosis. En animales pre-inmunizados el uso de dosis crecientes de Adv-Luciferasa no incrementan la expresión de Luciferasa a nivel hepático. Sin embargo, la actividad de la enzima a nivel tumoral es directamente proporcional a la dosis del vector administrada.

Referente a los niveles de expresión de luciferasa a nivel hepático en los animales pre-inmunizados se puede concluir que la expresión de AdV-Luc se encuentra significativamente reducida en comparación con controles ($p < 0.014$). Sin embargo, no se observó ningún incremento relacionado con la dosis, ya que los niveles de luciferasa permanecieron homogéneamente bajos, semejantes a los observados en los animales control que recibieron la más baja dosificación (2×10^9 v.p./tumor, $p > 0.424$). Ver las Figuras 27 y 28.

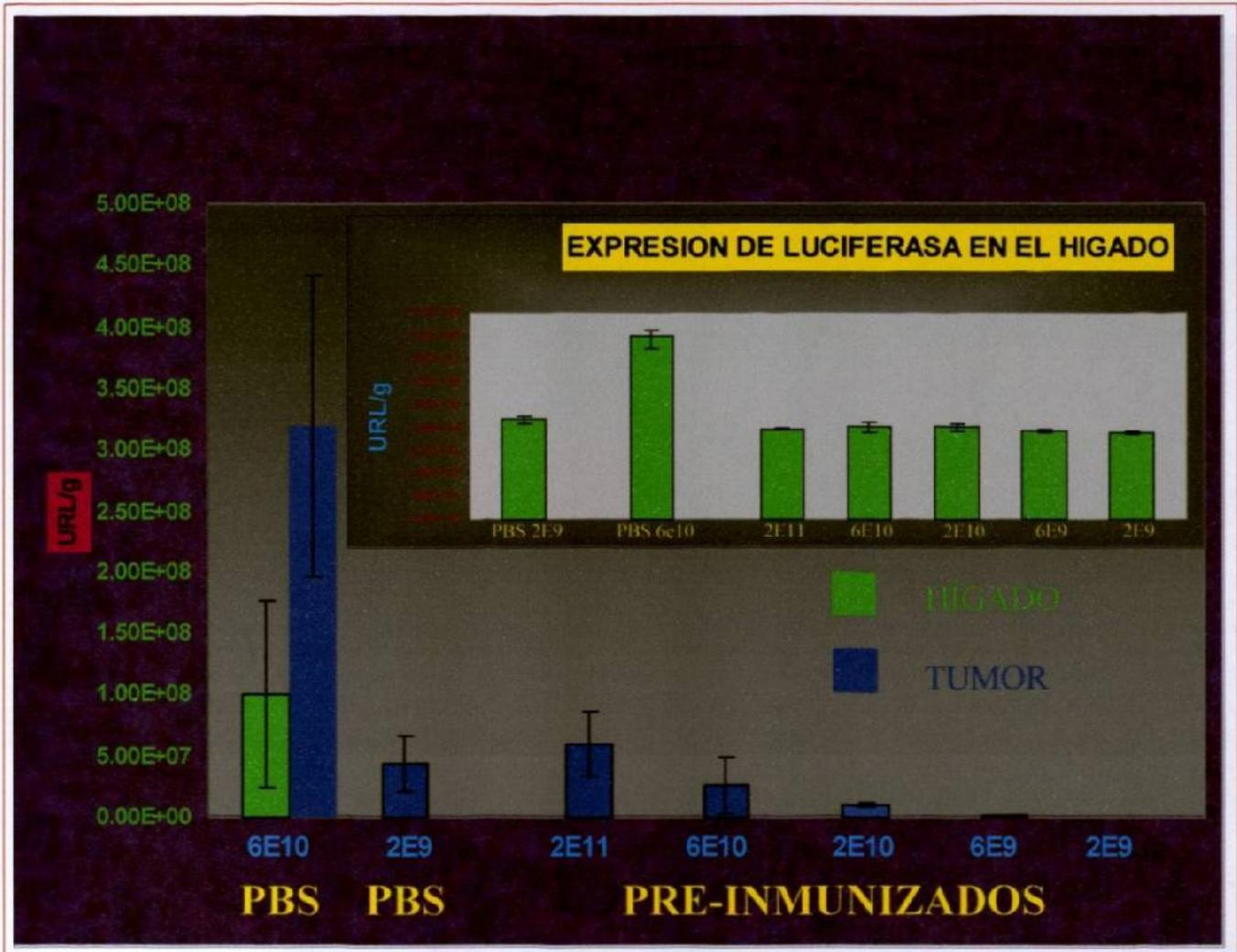


Figura 28. Expresión de luciferasa en animales preinmunizados e inoculados con dosis crecientes de AdV/Luc. El uso de dosis crecientes de Adv-Luc en ratones normales no inmunizados se traduce en una mayor expresión del transgen a nivel hepático cuando se incrementa la dosis. Mientras que en los animales pre-inmunizados, el uso de dosis crecientes de adenovirus se traduce en una mayor actividad de luciferasa a nivel local (IT), que la observada a nivel hepático.

Con la finalidad de comparar más ampliamente los niveles de expresión de luciferasa entre los dos tejidos de mayor interés en nuestro estudio, se analizaron las tasas tumor/hígado en cada uno de los grupos de estudio: en animales controles la tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc fue inversamente proporcional a la dosis inyectada del vector (69.72 para $6.00E+10$ v.p contra 1631.73 para $2.00E+9$ v.p. $p=0.002$) debido a que el incremento de la dosis de Adv-Luc se traduce en una desproporcionada expresión de la enzima en el hígado. Ver la **Figura 29**.

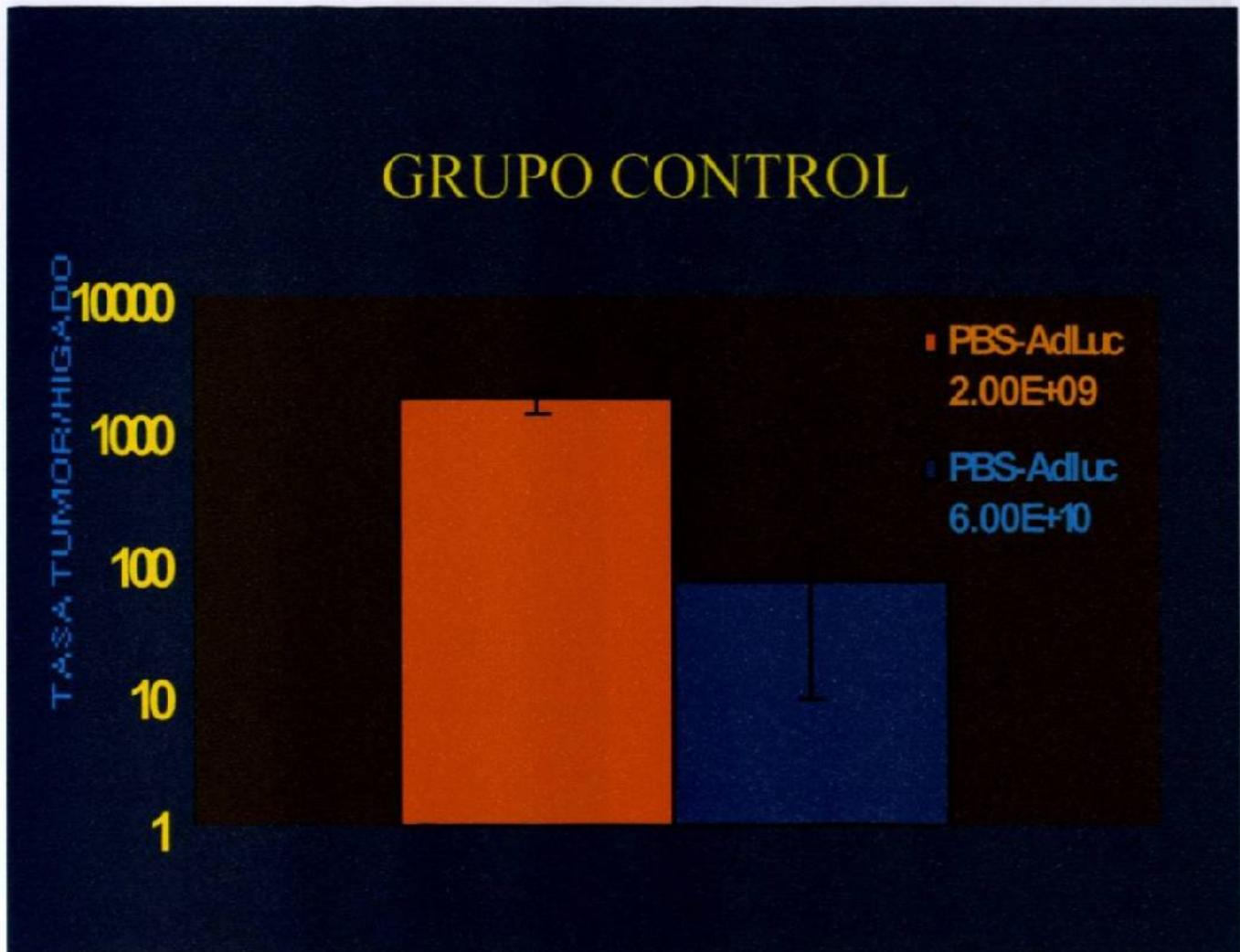


Figure 29. Tasa tumor-hígado en el grupo de ratones control. La tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc en ratones control fue inversamente proporcional a la dosis del vector que se inyectó dentro del tumor ($p=0.002$). Los resultados muestran una actividad de luciferasa desproporcionadamente alta como consecuencia del incremento de la dosis. Esta observación sugiere que el uso de dosis elevadas de AdV en animales normales, puede incrementar el riesgo de hepatotoxicidad.

En los animales pre-inmunizados la tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc se observó significativamente elevada, solamente en el grupo de animales que recibió la más alta dosificación ($p=0.008$). Asimismo, se apreció que la tasa tumor/hígado fue directa y proporcional con la cantidad del vector administrada ($p<0.003$). Estos resultados sugieren que la pre-inmunización limita la expresión de luciferasa en el hígado y sustentan la hipótesis de que la inmunidad celular pre-existente puede eliminar las partículas virales y a su correspondiente transgen del parénquima hepático. Ver la **Figura 30**.

una dosis creciente de adenovirus, ya que los títulos de anticuerpos correspondientes a cada una de las dosis administradas demostraron una marcada homogeneidad. Ver la **Figura 31**.

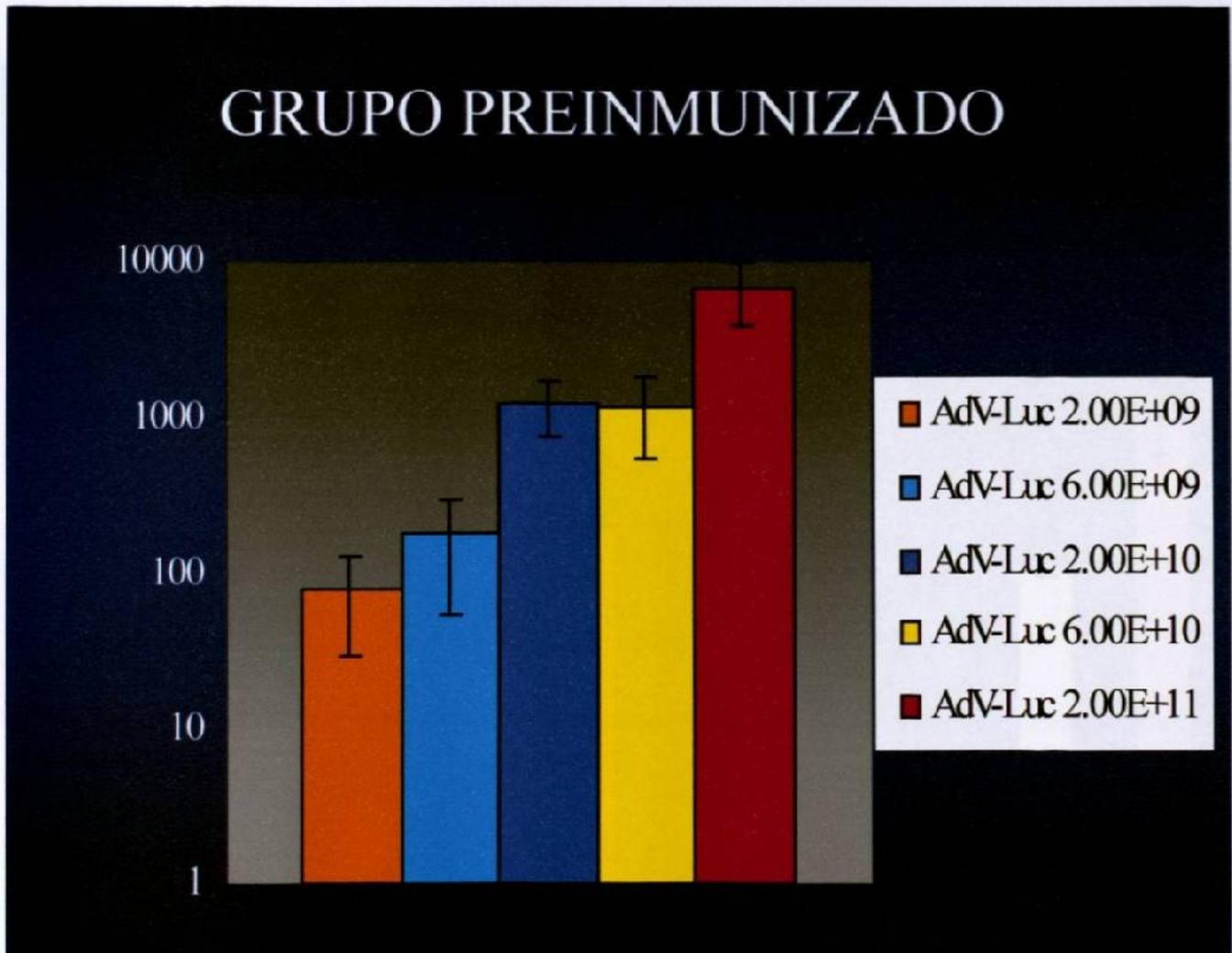


Figura 30. Tasa tumor-hígado en el grupo de ratones preinmunizados e inoculados con dosis crecientes de AdV/Luc. En los animales pre-inmunizados la tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc fue directa y proporcional con la cantidad del vector administrada ($p<0.003$). Los resultados sugieren que la pre-inmunización limita la expresión de luciferasa en el hígado.

una dosis creciente de adenovirus, ya que los títulos de anticuerpos en los animales preinmunizados en los controles. Sin embargo, no se apreció relativo efecto en ninguno de los grupos.

Los títulos de anticuerpos en contra de adenovirus fueron también analizados como una función dependiente de la dosis de AdV/Luciferasa, tanto en animales pre-inmunizados como en ratones controles. Dos días después de que los animales fueron reinmunizados por medio de la inyección intratumoral de AdV/Luc se observó un incremento significativo (1.7 X) en los títulos de anticuerpos en los animales preinmunizados en comparación con los controles ($p=0.000$). Sin embargo, no se apreció relación dosis-efecto en ninguno de los grupos de ratones preinmunizados e inoculados posteriormente con dosis crecientes de adenovirus, ya que los títulos de anticuerpos correspondientes a cada una de las dosificaciones demostraron una marcada homogeneidad. Ver la **Figura. 31**

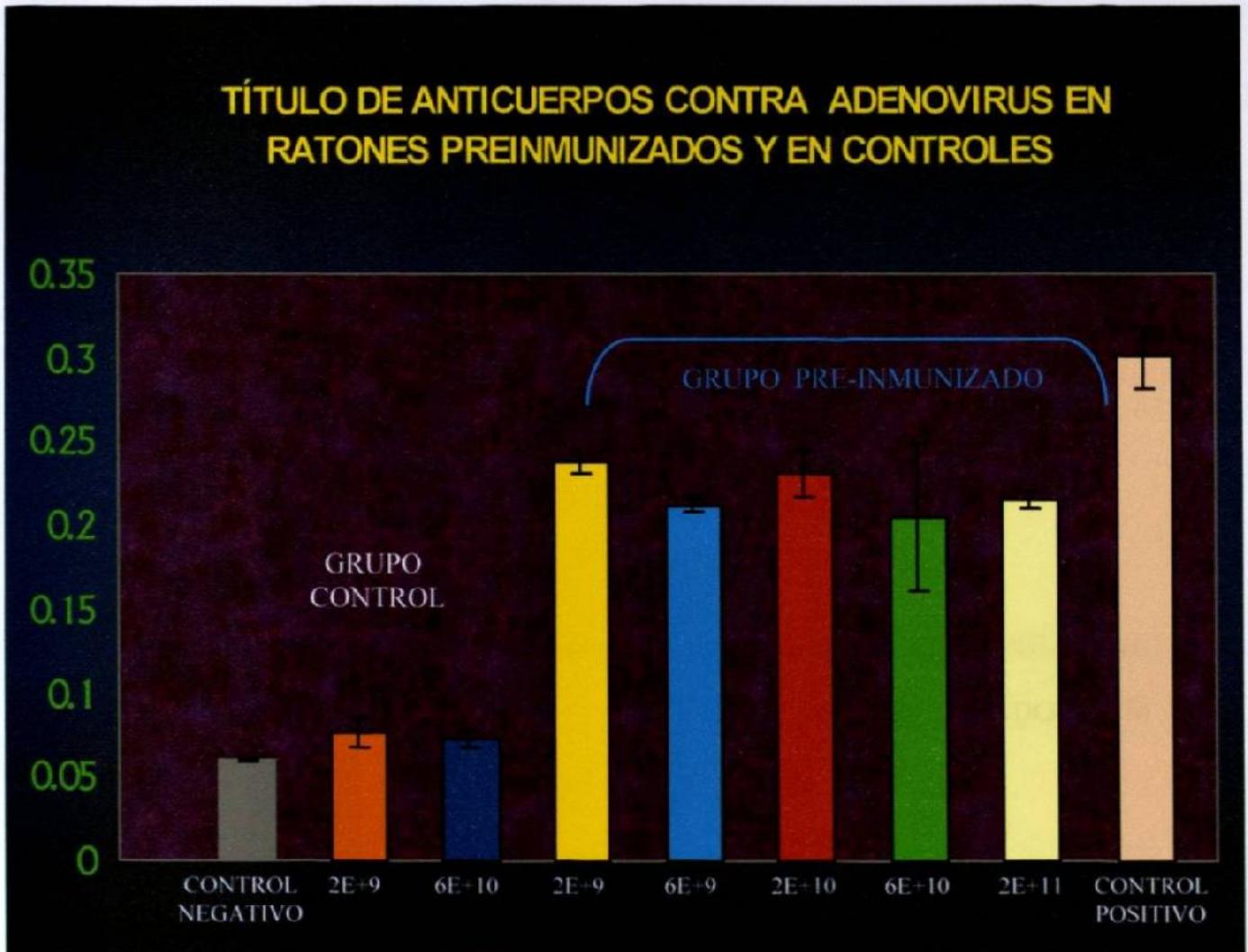


Figura 31. Títulos de anticuerpos analizados como una función de la dosis de AdV/Luc, tanto en animales pre-inmunizados como en controles. Dos días después de la reinmunización de AdV/Luc se observó un incremento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales preinmunizados en comparación con los controles. Sin embargo, no se apreció relación dosis-efecto en ninguno de los grupos.

Los estudios anatomopatológicos practicados en los grupos de ratones normales y pre-inmunizados, que recibieron AdV-Luc a una dosis de 2×10^{11} , v.p./ $20 \mu\text{l}$ /tumor, revelaron una frecuencia significativamente mayor de hepato-toxicidad en el grupo de animales preinmunizados. Específicamente, todos los ratones preinmunizados desarrollaron hepatitis grado 2-3 ($M=2.75$), mientras que en el grupo control, solamente un animal presentó hepatitis grado 2 para una media de 0.67 ($p=0.000$).

Una observación particularmente importante, fue que el grupo de animales preinmunizados presentó una mortalidad superior al 50%, ya que 6 de los 10 animales murieron después de la re-inmunización. Con respecto al grupo control, solamente se observó una defunción posterior al tratamiento. Debido a que la muerte de los animales ocurrió durante la noche, no fue posible efectuar el estudio histológico de sus órganos, aunque la necropsia realizada en algunos de ellos evidenció una importante hepatomegalia combinada con zonas de posible hemorragia y/o necrosis.

Con estos datos, podemos especular que una falla hepática aguda puede explicar el elevado porcentaje de mortalidad en los ratones preinmunizados, ya que todos los animales sobrevivientes presentaron evidencia histológica de hepatitis modera o severa. Finalmente, el estudio microscópico de los otros órganos no demostró evidencia de cito-toxicidad en ninguno de los grupos. Ver la **Figura 32**.

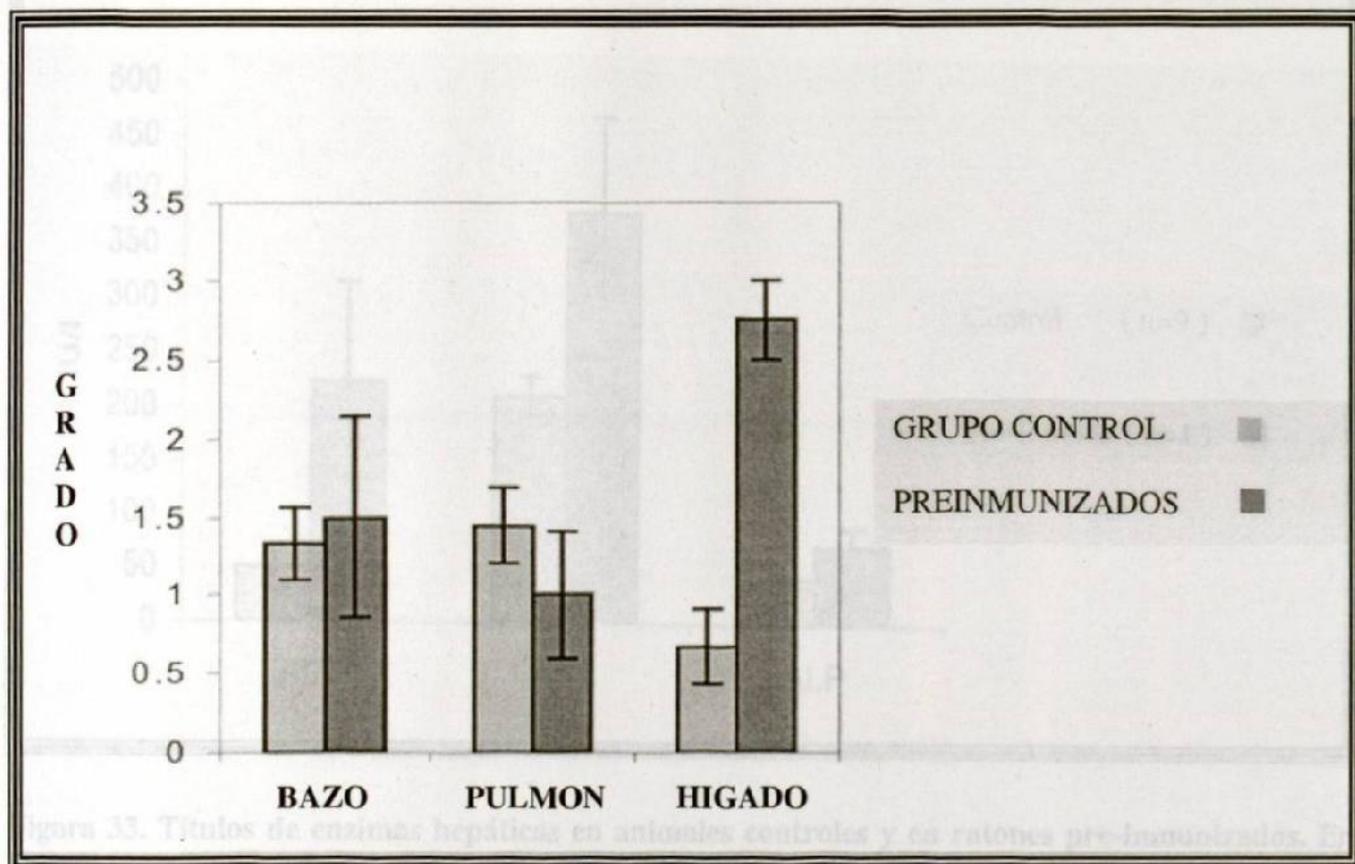


Figura 32. Citotoxicidad de Adv-Luc sobre tejidos normales en animales controles y preinmunizados. La evaluación histológica en tejidos normales recolectados 3 días después de la administración de AdV-Luciferasa, mostró un índice elevado de hepatitis en el grupo de ratones preinmunizados, mientras que en el resto de los órganos no se observaron diferencias significativas.

La actividad de las transaminasas en el suero es una medida relativamente inespecífica de daño celular, por lo tanto, los trastornos hepáticos que se acompañan de inflamación, necrosis celular o de alteraciones de la permeabilidad celular pueden dar lugar a una elevación de la concentración de transaminasas en el suero. Las elevaciones mayores se observan en la hepatitis aguda, en la que el aumento de transaminasas presenta un curso temporal semejante al de la bilirrubina.

En nuestro estudio la comparación de los niveles de enzimas hepáticas observados entre ambos grupos de estudio demostró: que el promedio de la enzima Alanina aminotransferasa (ALT) se incrementó de 50.78 UI/l +/- 58.28 DS (Desv. Estándar) en ratones normales a 241UI/l +/- 181.40 en animales preinmunizados. Con referencia a las enzimas Aspartato aminotransferasa (AST) y Fosfatasa Alcalina (ALP), también se observó un ligero incremento en cada una de ellas: de 211UI/l +/- 53.57 y 41UI/l +/- 6.77 en controles contra 381 UI/l +/- 177.24 y 71UI/l +/- 34.21 de los animales preinmunizados respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Ver la **Figura 33**.

observada en el resto de los ratones preinmunizados (0.25 log) y ligeramente mayor que la reportada para los animales controles (0.07 log). Este observación no se repitió en el grupo de ratones preinmunizados con AdV+MPG, lo cual se debe a que el MPG es la forma inactiva del TMPG. El

MPG disminuye la capacidad inmunogénica de las partículas virales. Sugiriendo que la encapsulación de vector oculta los epítopos de las proteínas de la cápside, disminuyendo así la producción de anticuerpos (ver la Figura 34).

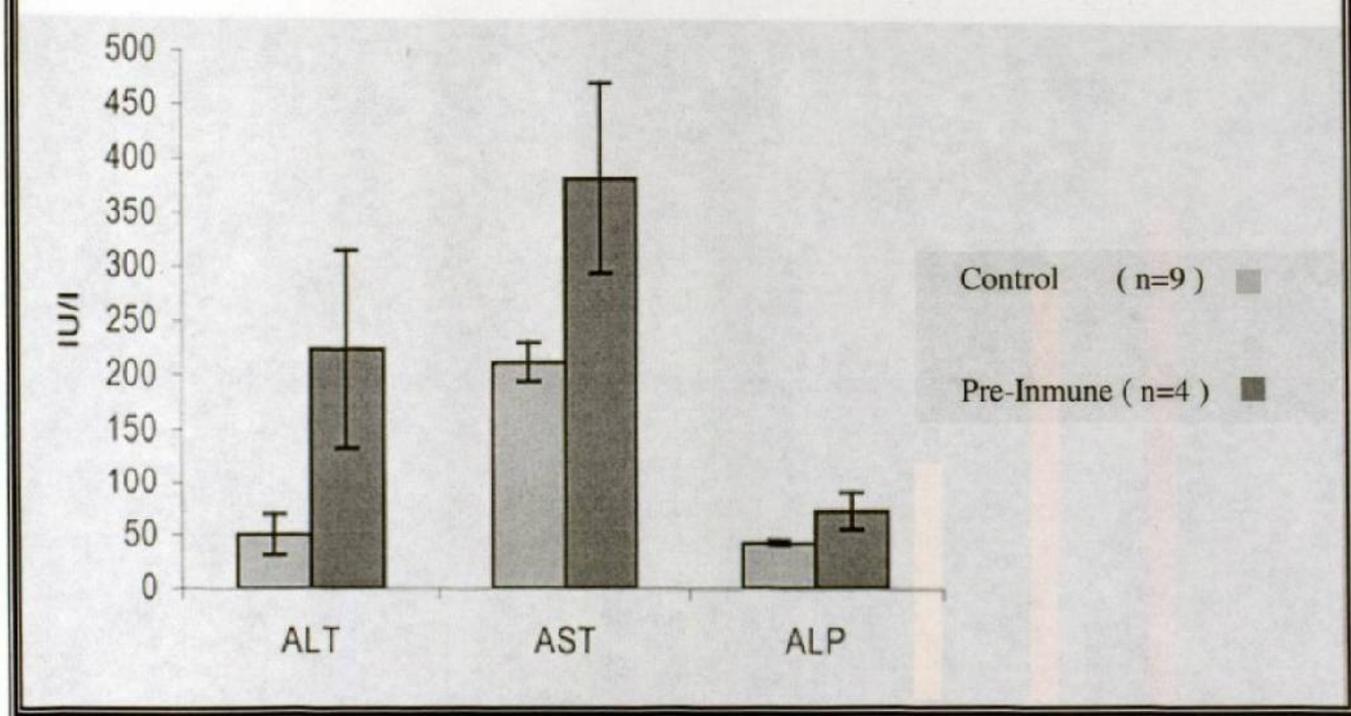


Figura 33. Títulos de enzimas hepáticas en animales controles y en ratones pre-inmunizados. En animales preinmunizados se observa un incremento en los promedios de enzimas hepáticas al compararlo con controles. Particularmente de la enzima Alanin-amino transferasa (de 50.78 Ui/l +/- 58.28 DE a 224 Ui/l +/- 181.40 DE) y de Aspartato-amino transferasa (de 211 Ui/l +/- 53.57 DE a 381 Ui/l +/- 177.24 DE). [DE = Desviación Estandar].

8.3 Desarrollo de Esquemas para Disminuir la Inmunogenicidad de los Vectores Adenovirales.

Durante la última etapa de investigación se establecieron 5 diferentes grupos de ratones sujetos a preinmunización (figura 18), uno de los cuales recibió solo PBS (controles), 2 grupos fueron inyectados IT con AdV- FT2M59 (1×10^{11} V.P) y los 2 restantes recibieron AdV- FT2M59+TMPEG y AdV- FT2M59+MPEG respectivamente. Todos los animales preinmunizados mostraron una mayor titulación de anticuerpos en comparación con los controles salinos y los sueros tomados antes de la inmunización. Aunque cada grupo de tratamiento presentó diferentes niveles de anticuerpos específicos en contra de adenovirus, todos los niveles fueron lo suficientemente elevados para neutralizar al vector y limitar su transferencia.

Una observación importante radica en el hecho de que en los animales preinmunizados con adenovirus encapsulados con TMPG, la producción de anticuerpos fue considerablemente menor (0.15 log) que la observada en el resto de los ratones preinmunizados (0.25 log) y ligeramente mayor que la reportada para los animales controles (0.07 log). Este observación no se repitió en el grupo de ratones preinmunizados con AdV+MPG, lo cual se debe a que el MPG es la forma inactiva del TMPG. El análisis de estos resultados nos permite concluir que la conjugación de adenovirus con polímeros de PEG disminuye la capacidad inmunogénica de las partículas virales. Sugiriendo que la encapsulación del vector oculta los epítopes de las proteínas de la cápside, disminuyendo así la producción de anticuerpos. Ver la **Figura 34**.

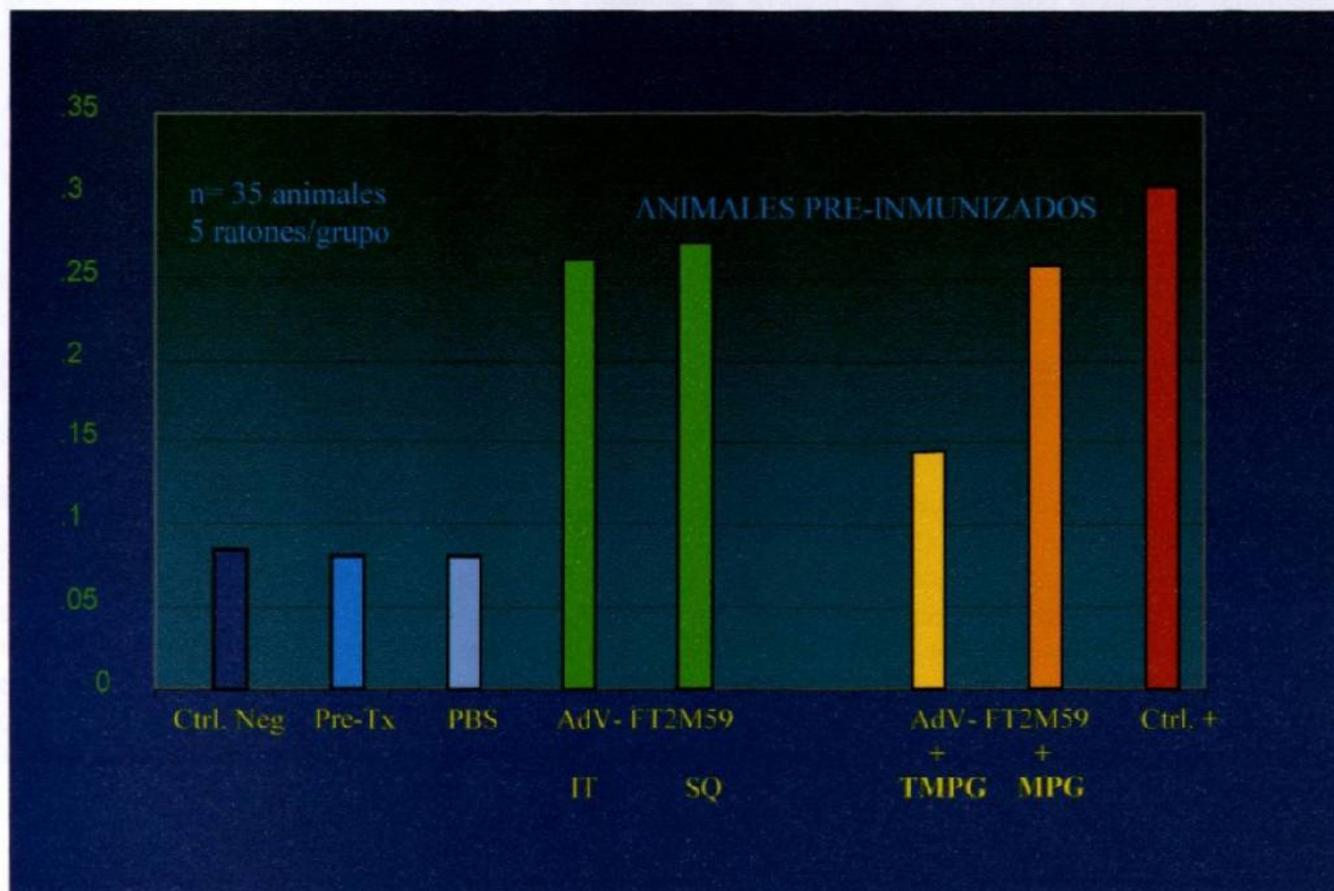


Figura 34. Titulación de anticuerpos en contra de adenovirus encapsulados con polímeros de polietilenglicol.

La expresión de luciferasa dentro del grupo control se observó considerablemente más elevada que en los grupos de ratones preinmunizados, lo cual está en concordancia con nuestros resultados previos. Un hallazgo particularmente interesante fue el apreciar que la expresión de luciferasa en todos los animales que fueron reinmunizados con el conjugado AdV-Luc+TMPG o AdV-GFP+TMPG se encontró en valores limítrofes con los del control negativo. Este hecho nos indica que la eficacia en la transducción fue totalmente abolida, tal vez por la supresión de la capacidad infectiva de los viriones a causa de un exceso de TMPG que no participó en la formación de conjugados, o bien a un exceso de lisina o bio-productos secundarios a la PEGilación; los cuales no fueron eliminados después de la reacción de conjugación. Por esta razón, al término de la conjugación se recomienda utilizar gradientes de cloruro de cesio o los nuevos métodos para eliminación de bio-productos tales como las columnas de Sephadex G-50 equilibradas con PBS (10 mM pH7.4) y combinadas con su correspondiente amortiguador de intercambio¹¹.

El análisis estadístico de los resultados demostró un significativo incremento en la expresión hepática de Adv-Luc en los animales controles ($1.60E+07$), al comparar dicha expresión con la observada en el resto de los grupos se aprecia un incremento de 2 a 5 logs ($p= 0.000$). Resultados similares son observados al analizar la actividad de luciferasa en el bazo y ovario así como en el correspondiente ensayo de la proteína verde fluorescente (datos no mostrados).

Nuestros estudios iniciales demostraron que la PEGilación disminuye la producción de anticuerpos generados en contra de adenovirus. Con la finalidad de evaluar que significado tiene este fenómeno sobre la expresión de las proteínas reporteras y su repercusión sobre los esquemas terapéuticos y readministración de vectores en el tratamiento de neoplasias sólidas, se inmunizó a dos grupos de animales con preparaciones PEGiladas de adenovirus. Estos animales fueron re-inmunizados dos semanas más tarde con una dosis semejante de AdV-Luc, y los niveles de expresión de luciferasa fueron medidos dos días después en cada uno de los órganos.

Al respecto, se observó una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa en todos los órganos. Esta disminución fue más importante en el hígado, ya que al analizar los niveles de expresión de luciferasa dentro del tumor fue posible observar un importante incremento en la expresión de Adv-Luc ($6.0E+06$) dentro de este grupo de ratones que fueron pre-inmunizados con AdV-FT2M59+TMPEG, al comparar dicho promedio con el observado en el resto de los animales preinmunizados se observa una diferencia significativa a nivel de (0.004).

Estas observaciones concuerdan con la baja titulación de anticuerpos encontrada en los ratones de este grupo, lo cual soporta la hipótesis de que la PEGilación de adenovirus disminuye la inmunogenicidad de los mismos e incrementa el nivel de expresión del transgen a nivel tumoral en los animales preinmunizados. Por otro lado, la significativa reducción de luciferasa dentro del hígado soporta nuestras observaciones previas que indican que la inmunidad celular es el factor de mayor importancia en la eliminación de viriones y sus correspondiente transgen dentro del parénquima hepático. Mientras que la inmunidad humoral participa principalmente en la neutralización de adenovirus a nivel local (IT). Ver la **Figura 35**.

1. DISCUSIÓN

Las vacunas administradas experimentalmente en grupos preinmunizados que se han hecho distinción en su respuesta por medio de la detección de los péptidos de expresión temprana E1a y E1b, han demostrado un mayor nivel de actividad en poblaciones de células genéticamente homogéneas. El mecanismo natural que se sigue para responder frente al estímulo y generar un campo de células nuevas para infectar

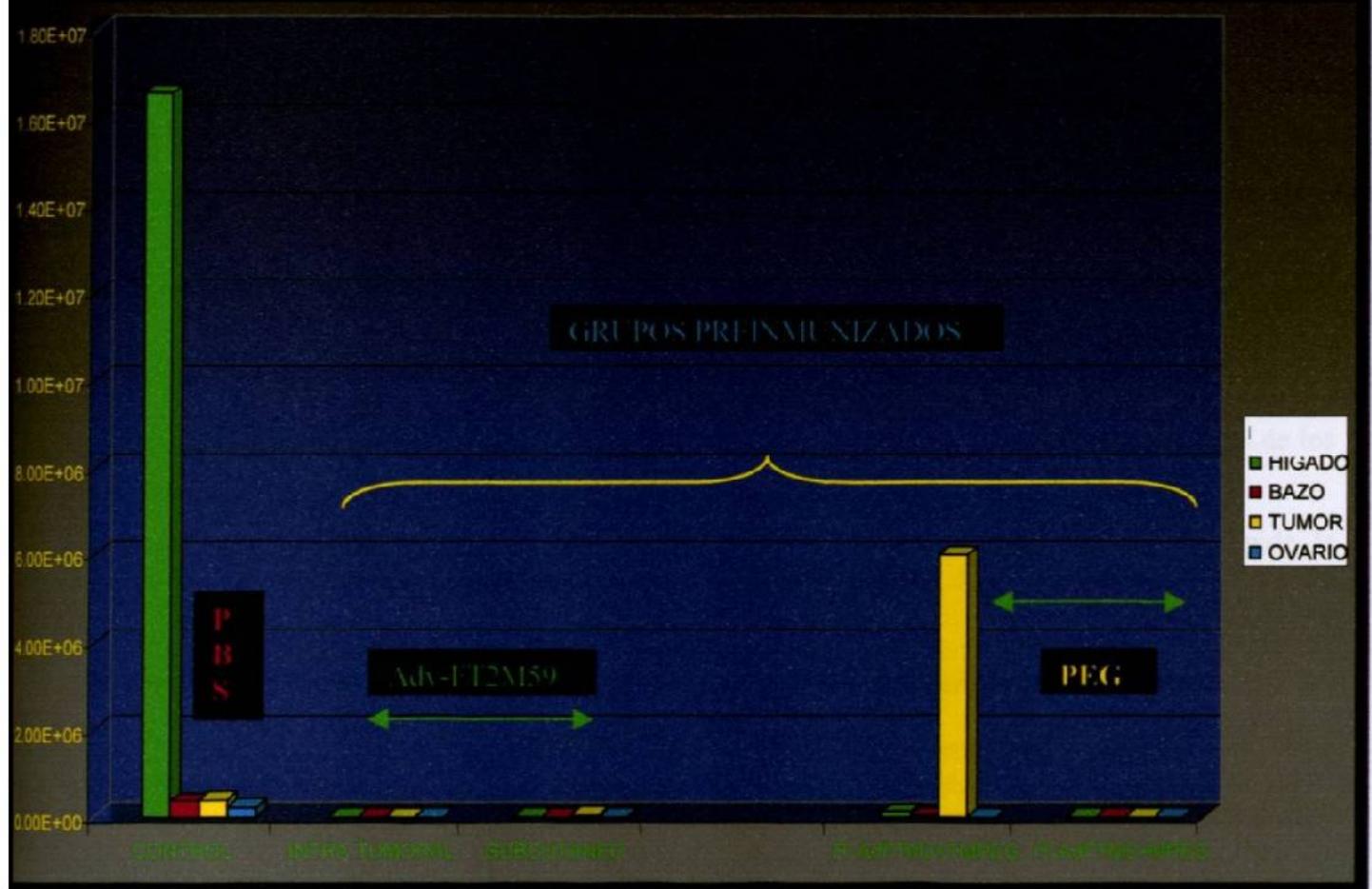


Figura 35. Actividad de luciferasa en el día 16 en ratones preinmunizados con AdFTM2 y adenovirus encapsulados con polímeros de polietilenglicol. Nótese que los adenovirus recubiertos con TMPEG se tornan menos inmunogénicos, lo cual se traduce en un mayor nivel de expresión intratumoral de la enzima luciferasa entre los ratones que fueron preinmunizados con el vector AdV- FT2M59 encapsulado con TMPEG.

9. DISCUSIÓN

Los vectores adenovirales recombinantes de primera generación que se han hecho deficientes en su replicación por medio de la delección de las regiones de expresión temprana E1a y E1b, han demostrado ser excelentes vehículos en protocolos de terapia génica de células somáticas. El tropismo natural que los adenovirus presentan hacia el hígado y pulmón, así como las facilidades técnicas para inyectar algunos tipos de tumores sólidos, los coloca como atractivos candidatos para el tratamiento de neumopatías, enfermedades hepáticas y en el tratamiento del cáncer.

Sin embargo, el entusiasmo inicialmente desencadenado con el uso de vectores adenovirales, se ha visto disminuido a causa de la inestabilidad del transgen atribuida a los mecanismos de respuesta inmune generados en contra de las células que expresan los productos transgénicos de origen viral. Además la eficiencia en la expresión se nota severamente disminuida después de la readministración del vector, a causa de la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos en contra de las proteínas virales.

La trascendencia de estos conocimientos en el futuro desarrollo de protocolos de terapia génica para el tratamiento del cáncer es incuestionable, y se encuentra respaldada por la naturaleza de nuestras observaciones. Un análisis retrospectivo de las mismas nos permite formular las siguientes aseveraciones:

La actividad de luciferasa en los ratones normales es extremadamente elevada ya que los animales carecen de anticuerpos que puedan obstaculizar la transferencia génica de los genes reporteros y/o impedir la diseminación sistémica del vector. Cuando estos animales son inmunizados se aprecia una sobreproducción de anticuerpos una semana después de la inyección inicial del vector. Simultáneamente, aparece una significativa disminución en la actividad de luciferasa en cada uno de los tejidos analizados.

Esta observación sustenta que la presentación de anticuerpos en contra de adenovirus impide la internalización de los viriones y reduce la transducción intratumoral del transgen, limitando así la inyección repetida del vector en el tratamiento de tumores sólidos. Asimismo, nos permite concluir que el nivel de expresión de los genes reporteros en los animales preinmunizados es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus.

En los animales no inmunizados la diseminación de los vectores adenovirales desde el sitio de la inyección es homogénea y de carácter sistémico, ya que dos días después de la inyección I.T de AdV-Luc se observa un significativo incremento en la expresión de luciferasa en cada uno de los tejidos examinados, mientras que en los grupos de ratones preinmunizados por vía IT y SQ se aprecia un significativo decremento en la actividad de la enzima.

Un conocimiento adicional derivado del estudio de los animales controles se obtiene al comparar la actividad de luciferasa, antes (día 16) y después de la producción de anticuerpos (día 21 y 28), dentro de cada uno de los tejidos analizados; concluyéndose que la aparición de anticuerpos limita la expresión de luciferasa principalmente a nivel tumoral y en menor grado a nivel sistémico, ya que los niveles de la proteína reportera disminuyeron en el hígado de $3.00E+8$ a $2.00E+8$ ($p=.399$), en el bazo de $2.50E+8$ a $1.00E+7$ ($p=.023$) en ovario, de $1.00E+8$ a $3.00E+6$ ($p=.228$) y dentro del tumor de $3.00E+8$ a $7.00E+6$ ($p=.003$).

La peculiaridad de estos resultados se explica por el hecho de que durante el día 16 los animales controles no han tenido tiempo de desarrollar una respuesta inmune, ya que sólo han transcurrido 2 días después de su inmunización (día 14), mientras que los animales experimentales (IT y SQ) recibieron la inyección inicial del vector 2 semanas antes (día 0), por lo cual a esta altura del experimento ya han montado una vigorosa respuesta humoral, que limita la expresión de la proteína reportera.

En los animales preinmunizados la comparación de los resultados de expresión de luciferasa durante los días 21 y 28 del experimento no demostró diferencias significativas. Este hecho se atribuye a la poderosa respuesta inmune montada en contra de adenovirus en los grupos de ratones inmunizados, por lo que la sobreproducción de anticuerpos a las 3 y 4 semanas después de la primo-infección disminuye de manera homogénea y sistemática la expresión y/o actividad de la enzima luciferasa. Por otro lado, en el grupo control también se observa una significativa reducción en la actividad de luciferasa, a causa de que durante el día 21 del experimento, los ratones controles ya han tenido tiempo suficiente para alcanzar el primer pico en su producción de anticuerpos (una semana después de la inyección del vector durante el día 14). Ver las Figuras. 7, 19 y 24.

La vinculación de nuestros resultados en un modelo murino con inmunidad pre-existente en contra de adenovirus corrobora nuestra hipótesis de trabajo (H1). Ya que en los ratones con inmunidad pre-existente que recibieron la inyección intratumoral de un adenovirus portador del gen reportero que codifica para la enzima Luciferasa; la eficacia en la transducción y expresión del gen reportero fue modificada por la presencia de anticuerpos circulantes. Asimismo, los niveles de expresión intratumoral a lo largo del tiempo fueron modificados por la presentación de anticuerpos neutralizantes.

El estudio del comportamiento del gen reportero a nivel hepático demuestra un importante tropismo del vector por los hepatocitos ya que este órgano presentó los más altos niveles de expresión del transgen. La actividad de luciferasa dentro del hígado es persistente en ausencia de anticuerpos, pero una vez que se establece la respuesta humoral, la actividad de la enzima decrece considerablemente.

Otro aspecto de importancia se deriva de observar la actividad de luciferasa en el hígado dentro de cada grupo y a lo largo del tiempo. Desde esta perspectiva podemos observar que durante el día 16 en el grupo control se presentan los niveles más altos de actividad enzimática, en la misma fecha de estudio los niveles de Luc en los grupos IT y SQ se observa una significativa reducción en la expresión de Luc debido a que en estos animales ya se ha establecido una poderosa respuesta inmune, mientras que los animales control en esta fecha no han desarrollado anticuerpos.

Durante el día 21 y 28 ya se aprecia una disminución de la enzima dentro del grupo control y continua también en los ratones preinmunizados. Nótese que la actividad elevada de Luc en el hígado de los animales control durante los 3 tiempos de estudio ($3E+08$, $1.9E+08$ y $2E+08$). Sin embargo, la disminución de la actividad durante los días 21 y 28 no alcanza un log de diferencia (Figura 21). Cuando se aplica el mismo tipo de estudio en la actividad de Luc a nivel tumoral dentro de cada grupo y a lo largo del tiempo. Es posible observar que en el grupo control existe una importantísima disminución de Luc a partir de la primera semana de la primo-infección (día 16 = $3E+08$ v/s día 21 = $7E+06$ y día 28 = $4E+06$). Esta disminución es equivalente a 2 logs de diferencia. La explicación de esta observación se relaciona con la instalación de la respuesta inmune sinérgica con una masiva y rápida diseminación de las partículas virales desde el sitio de inyección intratumoral hacia el hígado y otros órganos. El mismo razonamiento explica porque no existen diferencias significativas en la expresión de Luc tumoral durante los días 21 y 28.

Al término de la primera etapa de investigación pudimos concluir que después de la inyección intratumoral de adenovirus en animales preinmunizados la respuesta inmune humoral en contra de adenovirus limita la expresión y transferencia de los genes recombinantes codificados en el genoma de las partículas virales. Esta disminución fue más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor.

La importante disminución en la expresión del transgen dentro del hígado puede ser ocasionada por dos diferentes eventos, cuya repercusión clínica es contradictoria: 1. La presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus limita la *diseminación sistémica del vector* y *apoya la posibilidad de utilizar dosis crecientes de adenovirus en animales pre-inmunizados*, sin observar efectos tóxicos colaterales y garantizando una elevada expresión de los genes de interés a nivel tumoral.

2. Los antígenos virales o el producto de los genes terapéuticos activan poblaciones de linfocitos T citotóxicos encargados de eliminar a los hepatocitos que han sido transducidos por el vector. La destrucción de un importante número de células en conjunto con un proceso inflamatorio inicial, explican la presentación de hepatitis, la limitación de la transferencia génica y la pérdida de expresión de la secuencia de interés, dentro del parénquima hepático.

Cuando AdV-Luc es administrado a ratones por vía intratumoral, la gran mayoría de las partículas virales se localiza inicialmente dentro del parénquima tumoral, pero en cuestión de horas se produce una importante diseminación sistémica del vector. Dicha diseminación tiene un tropismo especial hacia el hígado lo cual se fundamenta por el hecho de que los más altos niveles de expresión de luciferasa fueron observados en el hígado de los animales no inmunizados. Ver la **Figura 21**.

Por otro lado, existen evidencias (Elkon KB. 1997)¹⁹ que sostienen que durante las primeras 24-48 horas después de la infección, 90% del ADN viral es eliminado a través del hígado por medio de las células de Kupffer. A pesar de tan importante proceso de exclusión viral, el 95 % de los hepatocitos son transducidos dentro de los primeros días de postinfección, observándose la mayor expresión del transgen hacia el final de la primera semana de postinfección.

Los resultados de este trabajo fundamentan nuestros resultados en el grupo de animales controles en los cuales se observan los mayores niveles de expresión de luciferasa en todos los tejidos estudiados, dos días después de la inyección intratumoral del vector. La expresión del transgen declinó hacia el final de la primera semana hasta alcanzar los niveles basales tres semanas después de la inoculación. Desde esta perspectiva, la rápida eliminación de los adenovirus es atribuida a la porción celular de la respuesta inmune.

En este contexto podemos citar, que los cambios inflamatorios provocados por la infección de adenovirus en los tejidos periféricos se resuelven espontáneamente dentro de pocas semanas después de la primoinfección. Sin embargo, en el hígado los resultados a largo plazo después de la inflamación no están completamente comprendidos. Asimismo, la relación de la inflamación con la expresión de transgenes es de enorme importancia a la luz de los recientes protocolos de terapia génica, dirigidos al tratamiento del cáncer o de enfermedades hepáticas. La importancia clínica de nuestros resultados radica, en que a través de los mismos se demuestra que los vectores adenovirales de primera generación inducen cambios inflamatorios dentro del hígado de los animales con inmunidad pre-existente, dentro de los 3 primeros días después de la re-inoculación del vector.

Dicha observación sustenta el concepto de que los vectores virales utilizados en protocolos de terapia génica -dirigidos a tratar las enfermedades hepáticas y/o neoplásicas-, deben garantizar una elevada transducción celular y una persistente expresión de los genes de interés, en ausencia de efectos colaterales. Para lograr este propósito, los vectores virales así como la proteína codificada por el transgen deben de evitar la respuesta inmune antiviral generada a través de la primo-infección natural o inducida, la readministración del vector, o la diseminación de las partículas virales desde el sitio inicial de inyección hacia la periferia.

Nuestros resultados indican que la respuesta inmune montada en contra de los adenovirus de primera generación, es el factor principal que obstaculiza la transferencia del vector y limita la expresión de los genes recombinantes. La respuesta inmune humoral parece ser el factor principal que limita la expresión de las proteínas reporteras a nivel tumoral, mientras que una respuesta combinada, aunque predominantemente celular, explica la eliminación de las partículas virales y su correspondiente transgen dentro del parénquima hepático en los animales con inmunidad pre-existente. Debido parcialmente al desarrollo de una respuesta celular disparada previamente por las proteínas virales expresadas a nivel basal por los adenovirus deficientes en su replicación.

Otros factores que pueden limitar la expresión del transgen son el desarrollo de anticuerpos en contra de las proteínas codificadas por el transgen (luciferasa), la cantidad de partículas virales administradas, el promotor escogido para dirigir la expresión del gen recombinante y la citotoxicidad directa causada por el vector y/o la expresión de las proteínas virales.^{2,81}

La respuesta del huésped a la administración de un vector adenoviral varía de acuerdo a la dosis, el sitio de inoculación, las modificaciones del genoma viral y el tipo de transgen codificado por el vector. Cuando el Ad-vector es administrado a ratones por vía intravenosa, la gran mayoría de las partículas virales se localiza en el hígado. Durante las primeras 24-48 horas después de la infección, 90% del ADN viral es eliminado a través del hígado por medio de las células de Kupffer.¹⁹

La rápida eliminación de los adenovirus es atribuida a la porción celular de la respuesta inmune. Esta observación se fundamenta en los siguientes experimentos:

1. En ratones inmunodeficientes por bloqueo en la maduración de los linfocitos T y B, la expresión de transgenes codificados dentro de adenovirus se extiende hasta 4 meses después de la postinfección.⁸⁸ 2. En ratones inmunodeficientes Rag-2 infectados con adenovirus, la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺ y CD4⁺) procedentes de ratones normales infectados con adenovirus, provoca la eliminación del vector y el correspondiente transgen a los pocos días después de la transfusión.⁸⁰ 3. En ratones inmunocompetentes la supresión de las células CD8⁺ o CD4⁺ se traduce en una elevada y persistente expresión del transgen⁸⁶.

Con respecto a la inmunidad humoral nuestros resultados indican que en los animales controles la producción de anticuerpos en contra de adenovirus se inicia después de 48 horas de la inyección inicial del vector, alcanzando su mayor producción al término de la primera semana, comenzando a declinar hacia los 14 días de la primoinfección.

En los animales con inmunidad pre-existente se aprecian 2 picos en la producción de anticuerpos: el primero de ellos se observa 2 días después de la re-inmunización, mientras que el segundo se presenta después de 7 días de la segunda inyección del vector.

La peculiaridad de estos resultados indica que la respuesta humoral contra adenovirus es más rápida y eficiente en los animales preinmunizados, y explica por que la transferencia y expresión de los transgenes en los ratones con inmunidad pre-existente es considerablemente menor que en los animales controles. Nuestros resultados también demuestran que la producción de anticuerpos en los ratones inmunizados por vía IT o SQ es de la misma magnitud y duración.

La aplicación clínica de estos conocimientos explica el fracaso de muchos protocolos de terapia génica y cuestiona la utilidad de la inyección intratumoral directa de vectores adenovirales para el tratamiento de tumores sólidos, ya que su uso estará restringido a un primer ciclo semanal de tratamiento, pues la futura readministración del vector será inútil, debido a la sobreproducción de anticuerpos 7 días después de la inyección IT inicial del vector.

A la luz de esta evidencia, nosotros sugerimos utilizar los esquemas de terapia génica combinados con otro tipo de tratamiento alternativo (cirugía, radioterapia, quimioterapia), en la búsqueda de mejores resultados pronósticos y terapéuticos así como una mejor expectativa de vida.

En la actualidad se han desarrollado algunas estrategias dirigidas a atenuar los 2 tipos de respuesta inmune generados en contra de adenovirus. Así un numeroso grupo de fármacos tales como la ciclofosfamida, dexametasona e interleucina-12 entre otros, se han administrado en combinación con adenovirus, en un intento de bloquear los mecanismos de defensa montados en contra de los vectores y lograr una adecuada y persistente expresión de los genes recombinantes. Sin embargo, aunque estos regímenes terapéuticos reducen la respuesta inflamatoria, no inhiben la formación de anticuerpos neutralizantes, sugiriendo que la readministración de vectores puede no ser tan exitosa. Por otro lado, estas estrategias deterioran la inmunidad natural del paciente, además de que exhiben limitada eficacia y toxicidad⁴².

Con la finalidad de lograr una efectiva readministración de los vectores se han ensayado algunas estrategias consistentes en administrar anticuerpos monoclonales que inhiben la interacción coestimuladora entre células B y T⁴², otros intentos han consistido en suprimir la región E2a o la región E4 del genoma viral y/o reintroducir la región E3, la cual es responsable de los mecanismos de evasión inmunológica que ostentan los adenovirus. A pesar de ello se siguen observando anticuerpos neutralizantes en contra de estos vectores de segunda generación, comprometiendo su readministración.

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas que intentan disminuir la inmunogenicidad de los adenovirus, más que suprimir el establecimiento de la respuesta inmune. La PEGilación es un novedoso método consistente en conjugar polímeros de polietilén-glicol (PEG) con las proteínas de la cápside de los adenovirus. Esta técnica esta dirigida a ocultar los determinantes antigénicos de los viriones, tornándolos invisibles a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

No obstante el prometedor panorama ofrecido por esta metodología, existe evidencia controversial referente a la conservación de la capacidad infectiva de los adenovirus al término de la PEGilación. En los estudios descritos hasta aquí, hemos encontrado que la administración de vectores adenovirales encapsulados con TMPG no incrementa la eficiencia de la transducción cuando son administrados intratumoralmente.

Este efecto es totalmente inesperado, sobre todo si tenemos en cuenta que otros autores han reportado que el mecanismo de PEGilación incrementa los niveles de transducción tanto *in vivo* como en ensayos *in vitro*^{10,11}. Esto se atribuye a que este proceso enmascara los grupos químicos responsables de la carga negativa en la superficie de la cápside viral, produciendo un micro-ambiente que puede favorecer interacciones inespecíficas del virión con la membrana celular.

Alternativamente, existe evidencia controversial que sugiere que la PEGilación puede interferir con los mecanismos de fijación e internalización de las partículas virales, ya que la mayoría de los residuos de lisina que están presentes en la cápside viral se encuentran concentrados en las proteínas de la fibra y los pentones, las cuales son indispensables para el enlace y entrada hacia las células blanco.

Como la preparación de conjugados PEG-Proteínas requiere de la activación previa de los grupos hidroxilo en la molécula de PEG por medio de un reactivo que pueda ser totalmente substituido por grupos nucleofílicos (grupos ϵ -amino lisina) en la proteína durante la reacción de acoplamiento. Podemos suponer que la fijación de estos grupos al término de la PEGilación, pudiera interferir con los mecanismos de fijación o integración de los viriones⁸⁴.

Desde un punto de vista práctico, los resultados controversiales pueden ser ocasionados por problemas de tipo metodológico ya que la medición del tamaño de las partículas al final de un proceso de PEGilación revela que cada método produce una suspensión de partículas virales de diferente tamaño, lo cual incrementa la posibilidad de que un mayor número de viriones entren en contacto con la membrana celular. Aunque también, las diferencias en tamaño pueden interferir con el mecanismo de integración sobre todo si en el conjugado existen micro esferas que contienen conglomerados de viriones.

Este último ejemplo puede explicar la naturaleza de nuestros resultados ya que en nuestro método no eliminamos el exceso de TMPG que no participó en la formación de conjugados.

Los mecanismos de interacción del proceso de PEGilación con la respuesta inmune, han sido estudiados recientemente por algunos autores quienes sugieren que la unión covalente del PEG a las proteínas de la cápside es suficiente para reducir la producción de CTL generados en contra de las células infectadas por adenovirus¹¹, sin embargo hay pocos datos que permitan explicar la naturaleza del fenómeno, ya que la modificación de las proteínas de la cápside viral no impiden el desarrollo de una respuesta inmune alterna, en contra del producto codificado por el transgen, tal como la enzima luciferasa utilizada en nuestros experimentos.

La PEGilación, tampoco previene el desarrollo de anticuerpos en contra de las proteínas virales sintetizadas *de novo*. Nosotros creemos que poblaciones de CTL dirigidas en contra del transgen o de las nuevas proteínas, pudieran explicar la eventual eliminación de células infectadas por AdV-Luc o AdV-GFP. Por tal motivo decidimos utilizar un vector adenoviral carente de proteínas reporteras para inmunizar los diferentes grupos de animales, en orden de demostrar o descartar esta premisa.

Al recapitular los resultados observados en el grupo de ratones que fueron preinmunizados con el vector AdV- FT2M59+TMPEG, se puede observar que la expresión de luciferasa se encuentra significativamente disminuida principalmente en el hígado. Lo cual indica que a pesar de la PEGilación del vector y a su carencia de proteínas reporteras, este, fue capaz de producir una probable respuesta inmunológica de tipo celular que dirige la eliminación de los hepatocitos transducidos con el vector AdV-Luc.

La sobreproducción de anticuerpos neutralizantes en contra de adenovirus (NAB) es un problema universal en la mayoría de los experimentos de terapia génica basados en el uso de vectores virales. Nosotros demostramos aquí, que el simple recubrimiento de las proteínas de la cápside con TMPEG activado, es suficiente para disminuir los títulos de anticuerpos en los animales preinmunizados con AdV- FT2M59+TMPEG. Paralelamente, otros autores han demostrado que la PEGilación protege a los viriones en contra de la presencia de elevadas concentraciones de anticuerpos y permite una elevada expresión en modelos animales que presentan titulaciones elevadas de anticuerpos⁶⁵.

Asimismo, nuestros resultados indican que la producción de anticuerpos en contra de proteínas sintetizadas de novo puede también estar también disminuida, pues la evidencia biológica ya existente sustenta que los polímeros de PEG atenúan la capacidad inmunogénica de una gran cantidad de biomoléculas.^{39,70} lo cual es consistente con el importante nivel de expresión intratumoral obtenido con AdV-Luc en animales previamente expuestos al vector modificado (AdV- FT2M59+TMPEG).

Finalmente, la unión del polímero con la cápside puede alterar el procesamiento y/o estructura de las proteínas de la cápside revelando otros determinantes antigénicos o generando nuevos epítopes en los diferentes sitios de unión. Desde esta perspectiva, nuevos anticuerpos pueden ser entonces producidos en contra de secuencias polipeptídicas que originalmente fueron consideradas como no inmunogénicas por el sistema inmune del huésped.

Con la finalidad de dar respuesta a tan importantes interrogantes, es necesario el desarrollo de nuevos proyectos de investigación utilizando vectores de segunda generación, adoptando nuevos métodos de PEGilación o estandarizando los ya existentes y primordialmente, profundizar en los aspectos moleculares de la respuesta inmune. Antes de poder concluir que la PEGilación es el método de elección para disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales.

10. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten concluir las siguientes aseveraciones:

*En los animales no inmunizados la diseminación de los vectores adenovirales desde el sitio de la inyección es homogénea y de carácter sistémico.

*En animales pre-inmunizados se observó una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución fue más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor.

*La presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus limita la diseminación sistémica del vector y apoya la posibilidad de utilizar dosis crecientes de adenovirus en animales pre-inmunizados.

*La producción de anticuerpos neutralizantes inhibe la expresión de los genes reporteros. Los efectos de esta respuesta inmune se pueden disminuir a través de la encapsulación de adenovirus con polímeros de polietilén glicol.

*La inyección intratumoral de vectores adenovirales para el tratamiento de tumores sólidos otorga beneficios terapéuticos exclusivamente durante la primera inyección del vector, ya que la inmunogenicidad de los adenovirus, limita la expresión de los genes terapéuticos y obstaculiza la readministración intratumoral del vector.

*La inmunidad pre-existente en contra de adenovirus obstaculiza la expresión intratumoral y sistémica de los genes recombinantes transportados por los vectores adenovirales.

*Las diferentes estrategias de terapia génica actualmente utilizadas son insuficientes para garantizar un adecuado tratamiento del cáncer, por lo que su aplicación clínica es de carácter alternativo y/o sinérgico con otro tipo de esquemas terapéuticos.

*El uso de dosis crecientes de Adv-Luc en ratones normales no inmunizados se traduce en una mayor expresión del transgen a nivel hepático cuando se incrementa la dosis.

*En los animales pre-inmunizados el uso de dosis crecientes de adenovirus se traduce en una mayor actividad de luciferasa a nivel local (IT), que la observada a nivel hepático.

*La pre-inmunización puede incrementar y/o modificar los usos y aplicaciones de la inyección intratumoral de vectores adenovirales en protocolos de terapia génica.

***En animales pre-inmunizados es posible utilizar megadosis y/o inyecciones intratumorales múltiples de vectores virales con un incremento significativo en los niveles de expresión.**

***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.**

***Los fenómenos de toxicidad hepática observados en los animales pre-inmunizados necesitan ser validados con estudios similares al nuestro, debido a las enormes implicaciones terapéuticas que los vectores adenovirales tienen en el tratamiento del cáncer.**

***La modificación de la cápside viral con formas bioactivas de Polietilen-glicol (TMPEG) reduce la respuesta inmune humoral generada en contra de las proteínas virales.**

***Los adenovirus recubiertos con TMPEG se tornan menos inmunogénicos, lo cual se traduce en un mayor nivel de expresión intratumoral de la enzima luciferasa entre los ratones que fueron preinmunizados con el vector AdV- FT2M59 encapsulado.**

***El nivel de expresión de luciferasa en los grupos que fueron inyectados con Adv-Luc+TMPEG, fue nulo, lo cual fue atribuido a la carencia de una técnica adecuada para separar las partículas virales del exceso de TMPEG durante la encapsulación del vector.**

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Avery, Oswald, MacLeod, Colin, y McCarty, Maclyn, (1944): Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *Journal of Exp. Med.*, 79: 137-158.
2. B. Loser, P., Jennings, G. S., Strauss, M. y Sandig, V (1998): Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate- early promoter in the mouse liver: involvement of NF kappa. *J. Virol.* 72, 180-190
3. Berkner KL (1988): Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques*: 6(7), 616-629.
4. Bett A J, Haddara W, Prevec L y Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 91: 8802-8806.
5. Bett AJ, Prevec L y Graham FL (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J.Virol.* 67: 5911-5921.
6. Braiden V, Nagayama Y, Iitaka M, Namba H, Niwa M, y Yamashita S (1998): Retrovirus-mediated suicide gene/prodrug therapy targeting thyroid carcinoma using a thyroid-specific promoter. *Endocrinology*: Sep; 139(9), 3996-3999.
7. Burnett, JP y Harrington, JA. (1968): Infectivity associated with Simian adenovirus type SA7 DNA. *Nature* 220, 1245.
8. Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Debruyne FMJ, e Isaacs WB (1997): DD3: a new prostate specific marker strongly overexpressed in prostatic tumors. *J Urol* 157: 83A.
9. Butler M: *Mammalian Cell Biotechnology* (1991): IRL PRESS. Oxford University Press.
10. Croyle, M., Q. Yu, y J. Wilson. (2000): Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum. Gene Ther.* 11:1721-1730.
11. Croyle MA, Chirmule N, Zhang Y y Wilson JM (2001): "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J Virol* May;75(10):4792-801
12. Crysal, RG (1995): Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*: 270, 404-410.
13. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, y Blaese RM (1992): *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*: 256, 1550-1552.

14. Culver KW, Osborne WRA, Miller AD, Fleisher TA, Berger M, Anderson WF y Blaese RM (1991): Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc*: 23, 170-171.
15. Delgado, C., Francis G.E., y Fisher, D. (1992). *Uses and properties of PEG-Linked Proteins*. *Crit. Rev. Ther. Drug-Carrier Syst.* 9, 249-304.
16. Douglas Joanne T y Curiel David T (1977): Adenoviruses as vectors for gene therapy: Science and Medicine: March/April, 44-53.
17. Duncan SJ, Gordon FCA, Gregory DW, McPhie JL, Postlethwaite R, White R, y Willcox HNA (1978): Infection of mouse liver by human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 40, 45-61.
18. Chhikara M, Huang H, Vlachaki MT, Zhu X, Teh B, Chiu KJ, Woo S, Berner B, Smith EO, Oberg KC, Aguilar LK, Thompson TC, Butler EB y Aguilar-Cordova E. (2001): Enhanced therapeutic effect of HSV-tk+GCV gene therapy and ionizing radiation for prostate cancer. *Mol Ther.* 2001 Apr;3(4):536-42.
19. Elkon KB, Liu CC, Gall JG, Trevejo J, Marino MW, Abrahamsen KA, Song X, Zhou JL, Old LJ, Crystal RG y Falck-Pedersen E (1997): Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* Sep 2;94(18):9814-9
20. Francis, G.E., Fisher, D y Delgado, C. (1998): PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: The importance of biological optimization of coupling techniques. *Int. J. Hematol.* 68, 1-18
21. Freeman SM. (1993). The "bystander" effect: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53: 5274-5283.
22. Friedmann Theodore (1997): Overcoming the obstacles to gene therapy: *Scientific American*: June; 80-85.
23. Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Turz T, Boulanger P y Guillet JG. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and antipenton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity (1998): *J. Virol.* Mar; 72 (3): 2388-97.
24. Ginsberg HS y Prince GA (1994): The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect Agents Dis.* Feb;3(1):1-8. Review.
25. Goff SP (1992): Genetic of retroviral integration. *Ann. Rev. Genet.* 26: 527-544.
26. Graham, FL, y Van der EB, AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-67.
27. Graham FL y Prevec L (1991): Manipulation of adenovirus vectors. *In Methods in Molecular Biology, Vol 7: Gene Transfer and Expression Protocols*, edited by Murray, EJ, Clifton, NJ, The Humana Press, pp 109-128.

28. Graham, F., y A. J. Van der Eb. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467
29. Graham FL, Smiley J, Russel WC y Nairn R (1997): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-72.
30. Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, y Helenius A (1997): The role of nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J*: Oct 1, 16(19): 5998-6007.
31. Greber UF, Webster P, Weber J, y Helenius A (1996): The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J*: Apr 15, 15(8), 1766-1777.
32. Green M, y Pina M (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* 20, 199-207
33. Harvey B G, Hackett N R, El-Sawyt, Rosengart T K, Hirschowitz E A, Lieberman M D, Leesser M L y Crystal R G (1999): Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J. Virol.* Aug; 73 (8): 6729-42.
34. Herman JR, Scardino PT, Aguilar-cordova E, Woo SLC, Hall SJ, Timme TL, y Thompson TC (1997): Phase I clinical trial of in situ gene therapy in men with locally recurrence of prostate cancer after radiation. *J. Urol.* 157: 1294A.
35. Mutchinick O., Lisker R., Babinski V y Hernández García A. (1991): "Riesgo Para Síndrome de Down por Bienios y Quinquenios de Edad Materna en la Población Mexicana". *Boletín Médico Hospital Infantil De México*. Vol. 48(8):534-537.
36. Ho Dora Y y Sapolsky Robeert M (1997): Gene therapy for the nervous system. *Scientific American*: June; 96-100.
37. Horwitz MS (1991): Adenoviridae and their replication. In *Fundamental Virology*, edited by Fields, BN, New York, Raven Press, pp 771-813.
38. Hu WS y Temin HM (1990): Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*: 250, 1227-1233.
39. Inada, Y., M. Furukawa, H. Sasaki, Y. Kodera, M. Hiroto, H. Nishimura, y A. Matsushima. (1995): Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins. *Trends Biotechnol.* 13:86-91
40. Jhonson IS (1983): Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*: 219, 632-637.
41. Jiao S, Gurevich V y Wolff JA (1993): Long term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy. *Nature*: Apr 1, 362(6419): 450-453.

42. Jooss, K., Y. Yang, y J. M. Wilson. (1996): Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Hum. Gene Ther.* 7:1555-1566
43. Kaplan, JM., ST. George, JA., Pennington, SE., Keyes, L.D., Johnson, RP., Wadsworth, SC., y Smith, AE. (1996). Humoral and cellular immune responses of non-human primates to long term repeated lung exposure. *Gene Ther.* 3,117-127.
44. Katherine L. Molnar-Kimber., Daniel H, Sterman., Michael Chang., Eugen H, Kang, Mohammed ELBash., Michael Lanuti., Ashraf Elshami., Karen Gelfand, James M. Wilson., Larry R. Kaiser., y Steven M Albelda (1998): Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I trial for localized mesothelioma. *Human Gene Therapy* 9:2121-2133 (September 20).
45. Katz RA y Skalka AM (1994): The retroviral enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 133-173.
46. Kay, M. A., L. Meuse, A. M. Gown, P. Linsley, D. Hollenbaugh, A. Aruffo, H. D. Ochs, y C. B. Wilson. (1997): Transient immunomodulation with anti-CD40 ligans antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4686-4691
47. Kittrell F.S, Obom CJ y Medina D (1992): Development of mammary preneoplasias in vivo from mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Cancer Res.* Apr1; 52 (7):1924-32.
48. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, y Lovell-Badge R (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature:* 351, 117-121.
49. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF 3rd y Wilson JM (1996): Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet.* May;13(1):54-62.
50. Krieg Arthur (1997): Human endogenous retroviruses. *Science & Medicine: March/April;* 34-43.
51. Lai MMC (1992): RNA recombination in animals and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 61-79.
52. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD y Woo SL (1993): Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy.. *Hum Gene Ther* Aug;4(4):403-9
53. Larrick J W y Burck K L (1991): *Gene Therapy. Applications of Molecular Biology.* Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York. 1991.
54. Lehninger AL, Nelson DL y Cox MM (1993): *Principles of Biochemistry.* Second edition, Worth Publishers, Inc.
55. Lewin Benjamin(1997): *Genes VI.* Oxford University Press. 979-980.

56. McGrory WJ, Bautista DS y Graham FL (1998): A simple technique for rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5 vectors. *Virology* 163: 614-617.
57. McKusick VA: *Mendelian Inheritance in Man* (1992): Tenth edition, The John Hopkins University Press.
58. McLachlin JR, Cornetta K, Eglitis MA, y Anderson WF (1990): Retroviral-mediated gene transfer. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38, 91-135.
59. Marcel, T., y Grausz, J. D. (1997). The TMC worldwide gene therapy enrollment report, end 1996. *Hum Gene Ther.* 8, 775-800
60. Miller BE, Miller FR, Wilburn D y Heppner GH (1988): Dominance of a tumor subpopulation line in mixed heterogeneous mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 48: 5747-5753.
61. Mittal S K. (1993): Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter. *Virus Res.* 28: 67-90.
62. Naitoh J y Belldegrun A (1998): Gene therapy-the future is here: A guide to the practicing Urologist. *Urology*: 51 (3),367-380.
63. *Nature* (1981): NIH censure for Dr. Martin Cline: tighter rules for future research plans. *Jun 4*: 291 (5814): 369
64. Nielsen LL, Gurnani M, Syed J, Dell J, Hartman B, Cartwright M y Johnson R (1998): Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer: Efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Human Gene Therapy*: 9, 681-694.
65. O'Riordan, C., A. Lachapelle, C. Delgado, V. Parkes, S. Wadsworth, A. Smith, y G. Francis. (1999): PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther.* 10:1349-1358.
66. Postlethwaite R (1973): Liver damage induced in mice by human adenovirus type 5. *Scottish Med. J.* 18, 131.
67. Ramírez -Solís Ramiro y Bradley Allan (1994): Advances in the use of embryonic stem cell technology. *Current Opinion in Biotechnology*: 5, 528-533.
68. Rogers S (1971): Change in the structure of Shope papilloma virus-induced Arginase associated with mutation of the virus. *J Exp Med.* 1971 Dec 1;134(6):1442-52.
69. Rojas-Martínez A, Martínez-Dávila I, Hernández-García A, Aguilar-Córdova E y Barrera-Saldaña H. (2002): La Terapia Génica Del Cáncer. *Rev Invest Clin*; 54(1): 57-67.

69. Rowe WP, Huebner RJ, Gillmore LK, Parrish y Ward TG (1953): Isolation of cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84: 4200-4204.
70. Saito, T., H. Nishimura, T. Sekine, T. Urushibara, Y. Kodera, M. Hiroto, A. Matsushima, y Y. Inada. (1996): Tolerogenic capacity of poly(ethylene glycol) (PEG)-modified ovalbumins in relation to their immunoreactivity towards anti-ovalbumin antibody. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 8:311-321
71. Science (1976). No authors listed. Dec 10: 194 (4270): 1133-1135.
Recombinant DNA research: Beyond the NIH guidelines.
72. Science (1981): No authors listed. Dec 11: 214 (4526): 1220.
Cline loses two NIH grants.
73. Science (1982): No authors listed. Oct 1: 218 (4567): 37.
Martin Cline loses appeal on NIH grant.
74. Science (1986): No authors listed. Sep 26: 233 (4771): 1378-1379.
NIH asked to tighten gene therapy rules.
75. Science (1986): No authors listed. Oct 10: 234 (4773): 147.
NIH leaves gene therapy rules as is.
76. Smith RR, Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE y Thomas LB (1956): Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma de cervix. Cancer: 9, 1211-1218.
77. Smith TA, Mehaffey MG, Kayda DB, Saunders JM, Yei S, Trapnell BC, McClelland A, y kaleko M (1993): Adenovirus mediated expression of therapeutic levels of human factor 9 in mice. Nat Genet 5: 397-402.
78. Strayer D S. (1997): Titer replication-defective virus for use in gene transfer. Biotechniques 22, 447-450
79. Szbalska, EH y Szbalska W (1962): No Title Available. Proc. Natl Acad. Sci. USA 48, 2026
80. The Journal of Immunology (1995): Vol 155, Issue 5 2564-2570, Copyright © by American Association of Immunologists. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. Y Yang y JM Wilson.
81. Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG y Lowenstein PR (2000): Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 20;97(13):7482-7.
82. Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM y Leiden JM (1996): Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 1;93(20):10876-80.

83. Vile RG. (1994) Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSV-tk gene involves an immune component. *Cancer Res.* 1994, 54, 6228-6234.
84. Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos H, Mechtler K, Curiel DT, y Birnstiel ML (1992): Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA*: 89, 6099-6103.
85. Wainwright BJ, Scambler Pj, Schmidtke J, Watson EA, Law H-Y, y cols.(1985): Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. *Nature*: 318, 384-385.
86. Wigler, M, Silverstein, S, Lee LS, Pellicer, A, Cheng, YC, y Axel R. (1977): Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*: 11, 223-32.
87. Wigler, M, Sweet, R, Sim, GK, Wold, B, Pellicer, A, Lacy E, Maniatis T, Silverstein, S, y Axel R. (1979): Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell*: 16, 777-85.
88. Y Yang, FA Nunes, K Berencsi, EE Furth, E Gonczol y JM Wilson (1994): Cellular Immunity to Viral Antigens Limits E1-Deleted Adenoviruses for Gene Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 4407-4411, Copyright © by National Academy of Sciences.
89. Yang Y, Li Q, Ertl HC y Wilson JM (1995): Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol.* Apr;69(4):2004-15.
90. Yei S, Bachurski CJ, Weaver TE, Wert SE, Trapnell BC y Whitsett JA (1994): Adenoviral mediated gene transfer of human surfactant protein B to respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 329-336.
91. Zhang JF, Hu C, Geng Y, Selm J, Klein SB, Orazi A. y Taylor MW (1996): Treatment of a human breast cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4513-4518.
92. Zielenski Julian y Lap-Chee Tsui (1995): Cystic fibrosis genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genetics*: 29, 777-807.
93. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B y Stastny P. (2002): MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol.* Jan;63(1):30-9.
94. Zoolten Frederick L. (1997): Suicide genes for cancer therapy. *Science & Medicine* July/August, 16-25.



