

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**"TOXICIDAD DEBIDA A LA TRANSDUCCIÓN
ADENOVIRAL EN RATAS GESTANTES"**

Por

L.I.B.B. NAIKA GEORGINA RUEDA SÁNCHEZ

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

Diciembre, 2003

TM

QR39

.R8

2003

C.1

L.I.B.B. NAIKA GEORGINA RUEDA SÁNCHEZ

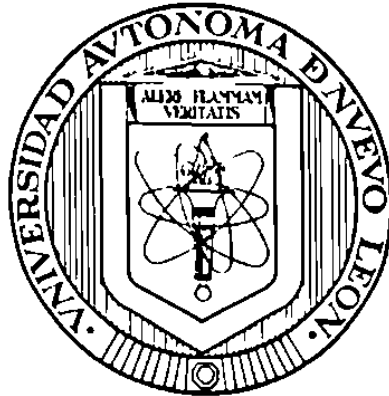


1080122760

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**"TOXICIDAD DEBIDA A LA TRANSDUCCIÓN
ADENOVIRAL EN RATAS GESTANTES"**

Por

L.I.B.B. NAIKA GEORGINA RUEDA SÁNCHEZ

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

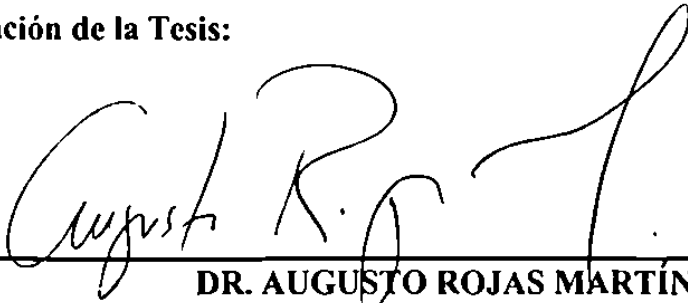
Diciembre, 2003

M



**TOXICIDAD DEBIDA A LA TRANSDUCCIÓN
ADENOVIRAL EN RATAS GESTANTES**


Aprobación de la Tesis:



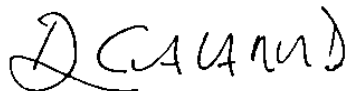
DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



M. en C. HÉCTOR GERARDO LOZANO GARZA
Miembro de la Comisión de Tesis



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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Terapia Génica de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica y en el laboratorio de procesamiento tisular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La manipulación de nuestro modelo animal se llevó a cabo en el Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y bajo la co-asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y el M. en C. Héctor Gerardo Lozano Garza. Para el análisis histopatológico y procesamiento de las muestras se contó con la asesoría del M. en C. Viktor Romero Díaz y del Dr. Jesús Ojeda Ibarra.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Augusto Rojas Martínez por abrirme las puertas de la investigación en terapia génica. Gracias por el apoyo y críticas en este proyecto.

Gracias:

Dr. Hugo Barrera por sus críticas en el trabajo realizado, por sus enseñanzas y por mostrarme la forma en que se lleva a cabo la investigación en el norte del país.

Dr. Gerardo Lozano por su asesoría y apoyo en la manipulación del modelo animal, por las enseñanzas, consejos y todo el tiempo compartido.

Dr. Jesús Ojeda Ibarra y M. en C. Víktor Romero Díaz por sus acertadas observaciones histopatológicas y por todos los consejos tanto laborales como personales.

Irma por todas las horas compartidas, por las enseñanzas, por los consejos, por la confianza y por brindarme tú preciada amistad.

Iván por criticar y enriquecer el trabajo. Gracias por tu amistad, comprensión, tolerancia y por permitirme conocer a tu hermosa familia.

Ángel y Andrés por sus asesorías computacionales, apoyo y motivación.

Cristian por tu asesoría técnica y apoyo en la producción, purificación, cuantificación y titulación adenoviral. Gracias por hacer amenos y gratos los ratos de desahogo.

Iram por tu asesoría casera y por todos los momentos y cenas compartidas.

Marichuy por toda la confianza y apoyo recibidos. Gracias por tu invaluable amistad.

Olivia por darme la oportunidad de conocerte, de convivir contigo y de tutearte. Gracias principalmente, por tu amistad.

Clarisa por brindarme tu amistad y confianza.

A todos mis demás compañeros en el departamento por todos los momentos compartidos.

A los amigos que han permanecido a mi lado a lo largo de estos años en que la distancia física ha aumentado entre nosotros. Gracias por los consejos, anécdotas, motivación, confianza, chistes e impulso recibidos.

A la vida por ser tan bella e incitar a vivirla plenamente.

A mis padres y hermanos por seguir siendo mi apoyo y sustento en todos los momentos de mi vida. Gracias por seguir siendo la mejor familia.

DEDICATORIAS

A Narda:

No hay palabras para expresarte toda la motivación que me trasmites. No hay día en el que deje de pensar en tí con una sonrisa en el rostro. Te amo mamá.

A Aurelio:

Mi admiración hacia ti crece día con día. Eres parte de un gran tesoro que llevo en el corazón; eres el amigo que me recuerda el equilibrio que debe existir en la balanza de mi vida y lo enriquecedor de las discusiones literarias. Te amo papá.

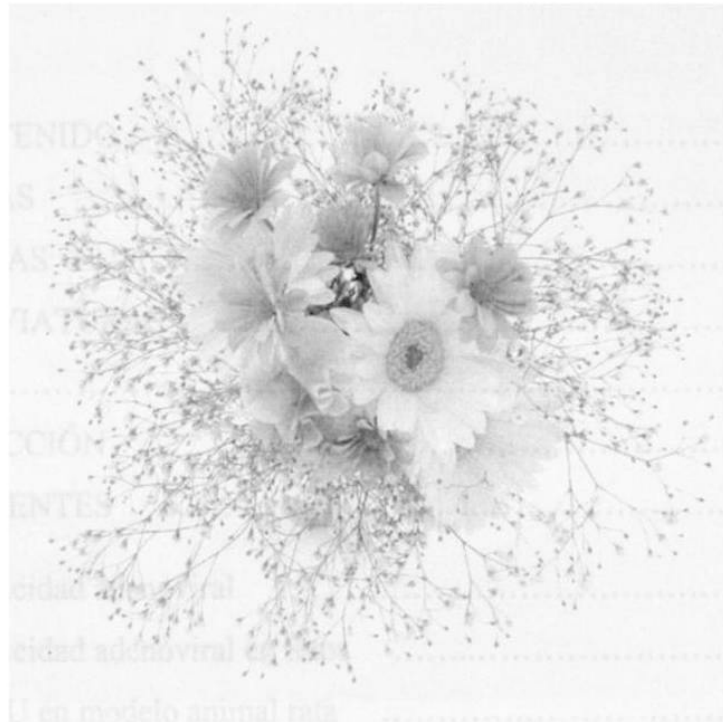
A Montserrat:

Eres increíble. Me agrada que la distancia nos permita extrañarnos e irnos conociendo conforme pasa el tiempo. Eres una joya reluciente que siempre está en mi corazón

A Orsy:

Guapo hermano mío, espero esto sea sólo un ejemplo de lo que podemos recibir de tí.

*El mundo está en manos de aquellos
que tienen el coraje de soñar
y de correr el riesgo
de vivir sus sueños.*



*Yesterday is
already a dream,
and tomorrow is
only a vision, but
today well lived,
makes every
yesterday
a dream of happiness
and every tomorrow
a vision of hope.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Toxicidad adenoviral	3
2.2 Toxicidad adenoviral en fetos	3
2.3 TGIU en modelo animal rata	4
2.4 Efectos de la TGIU en la rata gestante	4
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	6
4.2 Objetivos Específicos	6
5. HIPÓTESIS	7
6. MATERIAL	8
7. MÉTODOS	
7.1 Estrategia para la obtención de resultados	12
7.2 Producción y purificación adenoviral	13

7.3	Modelo animal	14
7.4	Reacción en cadena de la polimerasa	17
7.5	Análisis anatomopatológico	18
8.	RESULTADOS	22
8.1	Toxicidad	22
8.1.1	Hallazgos morfométricos	22
8.1.2	Hepatotoxicidad	27
8.2	Biodistribución	29
8.2.1	Amplificación de la secuencia CMV- <i>lacZ</i> en plasma ..	29
8.2.2	Observación directa de cortes en criostato	30
8.2.3	Inmunohistoquímica	
8.2.3.1	Indirecta (Anti Adenovirus serotipo 5)	31
8.2.3.2	Directa (Anti Proteína Verde Fluorescente) ..	32
8.3	Hallazgos anatomopatológicos	33
9.	DISCUSIONES	35
10.	CONCLUSIONES	37
ANEXOS	39
ANEXO A.	Metodología de la terapia génica	40
ANEXO B.	Vectores adenovirales	44
ANEXO C.	Empleo de genes reporteros	50
ANEXO D.	El ciclo estral en la rata	52
REFERENCIAS	55
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	65

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Pasos del tratamiento por la técnica de Papanicolaou.	14
Tabla II. Reactivos y condiciones de la PCR para <i>lacZ</i>	17
Tabla III. Pasos de la tinción HE.	19
Tabla IV. Observaciones con microscopio con luz UV de cortes congelados...	30
Tabla V. Resultados de la inmunohistoquímica indirecta.	31
Tabla VI. Resultados de la inmunohistoquímica directa.	32
Tabla VII. Función efectora de citocinas.	36

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Rata Sprague Dawley con sus crías.	11
Figura 2. Sistema Reprodutor de la Rata Hembra.	11
Figura 3. Esquema de la estrategia general.	12
Figura 4. Funcionalidad Adenoviral.	13
Figura 5. Frotis vaginales teñidos por la técnica de Papanicolaou.	15
Figura 6. AdV/RSV- <i>gfp</i>	15
Figura 7. AdV/CMV- <i>lacZ</i>	16
Figura 8. Mapa de amplificación virtual empleando el programa Amplify 1.0. ..	18
Figura 9. Procedimiento de la inmunohistoquímica directa.	20
Figura 10. Procedimiento de la inmunohistoquímica indirecta.	21
Figura 11. Peso de ratas con cirugía.	22

Figura 12. Peso de ratas sin cirugía.	23
Figura 13. Peso corporal al día 5 post-tratamiento (5 dpt).	23
Figura 14. Peso corporal total en grupos a largo plazo.	24
Figura 15. Temperatura corporal en grupos control.	24
Figura 16. Temperatura corporal de ratas transducidas vía intra-amniótica con la mAd.	25
Figura 17. Proporción del peso del órgano y el peso corporal total de acuerdo al tratamiento.	25
Figura 18. Proporción del peso del órgano y el peso corporal total de acuerdo a la vía de transducción en grupos control	26
Figura 19. Proporción del peso del órgano y el peso corporal total de acuerdo a la vía de transducción en grupos experimentales	26
Figura 20. Niveles de transaminasas (AST - ALT).	27
Figura 21. Niveles de bilirrubinas totales.	27
Figuras 22 y 23. Niveles de transaminasas (AST – ALT) y de bilirrubinas totales comparando el estado de gestación.	28
Figura 24. Fotografía de los geles de agarosa de productos de la PCR.	29
Figura 25. Fotografías tomadas de cortes realizados en criostato observados con microscopio con luz UV.	31
Figura 26. Fotografías con hallazgos anatomopatológicos en riñón y bazo. ..	33
Figura 27. Tinción hematoxilina-eosina de cortes semifinos de hígado.	34
Figura 28. La transferencia de información genética.	41
Figura 29. Adenovirus.	46
Figura 30. Infección adenoviral.	47
Figura 31. Respuesta inmune al adenovirus.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Virus adeno-asociado (del inglés “Adeno-Associated Virus”)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdE1 ⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E1
AdE3 ⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E3
AdV	Vector adenoviral
ALT	Alanina transaminasa
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato transaminasa
C+	Control positivo
CMV	Citomegalovirus
ClCs	Cloruro de cesio
Cn	Control negativo
Cols.	Colaboradores
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium”)
d.p.c.	Días post-cópula
d.p.t.	Días post-transducción o días post-tratamiento
FM	Facultad de medicina
G	Unidad de grosor de agujas
gest	Gestante
<i>gfp</i>	Gen codificante de la proteína verde fluorescente
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés “Green Fluorescent Protein”)
gr	Gramos
<i>gus</i>	Gen codificante de la enzima glucuronidasa

H	Hematoxilina
HE	Tinción con hematoxilina y eosina
HEK-293	Células humanas de riñón embrionario (del inglés “Human Embryonic Kidney cells”)
hr	Hora
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (que quiere decir: esto es)
IA	Intra-amniótica
EV	Endovenosa
IM	Intramuscular
IP	Intra-peritoneal
IU	Intra-uterina
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodaltones
K ₃ Fe(CN) ₆	Cianuro de hierro y potasio II
K ₄ Fe(CN) ₆	Cianuro de hierro y potasio III
<i>lacZ</i>	Gen codificante de la proteína beta-galactosidasa
LAP	Procedimiento quirúrgico de laparotomía
L.I.B.B.	Licenciatura en Investigación Biomédica Básica
LTR	Repeticiones terminales largas (del inglés “Long Terminal Repeats”)
mAd	Mezcla adenoviral (<i>Ad5/gfp-lacZ</i>)
MIX	Transducción con la mezcla adenoviral
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mm	Milímetro
n	Número
ngest	No gestante
NaCl	Cloruro de sodio

Na ₂ HPO ₄	Fósforo ácido de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fósforo diácido de sodio
nm	Nanómetros
OCT	Medio de inclusión OCT para tejidos congelados (del inglés “Optimal Cutting Temperature”)
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (del inglés “Phosphate-buffered saline”)
p. ejem.	Por ejemplo
p.v.	Partículas virales
p.v.t.	Partículas virales totales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reaction”)
pH	Concentración de hidrógeniones en solución
PM	Marcador de peso molecular
RSV	Virus del sarcoma de Rous (del inglés “Rous Sarcoma Virus”)
SE3	Sin E3
seg	Segundos
TaqPol	ADN Polimerasa Taq
TG	Terapia Génica
TGIU	Terapia Génica <i>in útero</i>
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
um	Unidades de mapa
v/v	Relación volumen/volumen
X	Número de magnificaciones al microscopio
X-gal	Reactivo de tinción para el revelado de los productos del gen <i>lacZ</i>

RESUMEN

L.I.B.B. Naika Georgina Rueda Sánchez

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Diciembre del 2003.

Área de Estudio: Terapia Génica.

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

Número de páginas: 65

Título del Estudio: "TOXICIDAD DEBIDA A LA TRANSDUCCIÓN ADENOVIRAL EN RATAS GESTANTES".

Objetivo: Estudiar los efectos tóxicos en ratas preñadas (15 días post cópula -d.p.c.-) transducidas con vectores adenovirales por diferentes rutas de administración, analizando la distribución del vector en diversos órganos y describiendo los hallazgos anatomopatológicos probablemente asociados a la transducción adenoviral.

Material y Métodos: Se emplearon ratas hembras Sprague Dawley con un peso aproximado de 200-300 gr. Al día 15 d.p.c. se realizó la inyección de los vectores adenovirales que contenían los genes reporteros Ad5/RSV-*gfp* y Ad5/CMV-*lacZ* en una concentración total de 3×10^{10} pv mediante las vías endovenosa, intraperitoneal e intra-amniótica. En un grupo de ratas no gestantes se realizó la transducción intrauterina; al grupo de ratas control sólo se le administró solución de buffer de fosfatos por las diferentes vías de transducción. Todas las ratas fueron sacrificadas a los 18-20 d.p.c. y a los 60/90 d.p.c. por ex-sanguinación bajo anestesia. Al suero obtenido se le realizaron estudios de laboratorio para determinar la concentración de bilirrubinas y transaminasas hepáticas. Del plasma se obtuvo ADN para corroborar la presencia de los vectores por PCR. Se realizaron estudios histopatológicos con tinción HE e inmunohistoquímica (usando anticuerpo anti-fibra de Ad5 y anticuerpo para la proteína verde fluorescente) de cortes del bulbo olfatorio, cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo, pulmón, hígado, riñón y sistema reproductor de las ratas tratadas.

Resultados: No se encontró hepatotoxicidad en los grupos de ratas gestantes. Se observó reducción del peso corporal total de los animales a los 5 días post-tratamiento como consecuencia al procedimiento quirúrgico. Se notó incremento en los niveles de AST en ratas no gestantes transducidas, lo cual no se observó en las ratas preñadas. En cuanto a la proporción entre el peso de los órganos y el peso total de la rata, tanto el bazo como el riñón tuvieron un aumento estadísticamente significativo en las ratas no gestantes transducidas con adenovirus en comparación con las ratas gestantes. El 30% de las muestras de plasma sanguíneo de ratas transducidas por las vías intra-amniótica e intra-uterina mostró positividad para ADN genómico del vector por PCR, mientras que el 50% de las muestras de las ratas gestantes transducidas por vía endovenosa fueron positivas. La histopatología demostró que el riñón y el bazo fueron los órganos mayormente dañados en todos los grupos experimentales, mientras que el hígado se encontró dañado en aquellas ratas no gestantes transducidas por vía intra-uterina. Se detectó la presencia del vector adenoviral diseminada en encéfalo (cerebro y cerebelo), pulmón, hígado, intestino, páncreas, bazo, corazón, riñón y sistema reproductor. Las observaciones para la proteína verde fluorescente correlacionaron tanto por observación directa como por inmunohistoquímica en encéfalo, pulmón, hígado y riñón. Las vías EV e IU se asociaron con transducción hepática. La presencia de dicha proteína fue mayor en hígado, corazón y riñón al examinarse por inmunohistoquímica.

Conclusiones: No se encontró hepatotoxicidad ni alteraciones físicas en las ratas gestantes transducidas. La cantidad de adenovirus circulante en estos animales fue dependiente de la vía de administración empleada y de la heterogeneidad del propio animal. El daño a bazo y riñón coincidió con el aumento de peso en los animales transducidos con la mezcla adenoviral (Ad5'*gfp-lacZ*), tanto en ratas gestantes como no gestantes. El daño a hígado se identificó solo en aquellas ratas transducidas con la mezcla adenoviral en estado no gestante. En las ratas gestantes, el daño hepático y renal varió según la ruta de administración del vector, siendo mayor en la vía intra-amniótica, seguida de las vías endovenosa e intraperitoneal.

ASESOR

Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-ASESOR

Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña

CO-ASESOR

M. en C. Héctor Gerardo Lozano Garza