

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La terapia génica (TG) es una estrategia médica para la transferencia de ADN benéfico en una gran variedad de enfermedades. Para poder lograr esta transferencia se han empleado diversos tipos de vectores, tanto virales como no virales. De los vectores virales, los adenovirus han sido ampliamente usados en protocolos, tanto en fases pre-clínicas como clínicas, debido a ventajas tales como la sencillez en la producción de partículas virales (p.v.), a que pueden infectar células ya sea en división o quiescentes, a su muy alta eficiencia al transfectar células diana tanto *ex vivo* como *in vivo*, a que pueden ser dirigidos para transfectar diferentes células diana, y a que raramente se integran al genoma de las células infectadas (Mountain y cols., 2000).

Los efectos terapéuticos que pueden obtenerse de las distintas modalidades de la TG, incluida la terapia génica *in utero* (TGIU), se deben balancear con sus efectos no deseados, tales como la toxicidad debida a las reacciones inmunológicas que despiertan en el huésped y los posibles efectos teratogénicos del vector o del producto del transgen (Hartig y cols., 1998; Casal y cols., 2000; Frederickson y cols., 2003; Friedman y cols., 2003). Aunque la TGIU con vectores adenovirales en modelos animales ha mostrado tener alguna potencialidad para el tratamiento gestacional de errores innatos del metabolismo (i.e. hemofilias, fibrosis quística, etc.), existen muy escasos reportes sobre los efectos tóxicos y la distribución del vector en la madre (Lai y cols., 2002).

Este estudio fué específicamente diseñado para el análisis de la toxicidad materna secundaria a la transducción de ratas preñadas y para la determinación de la distribución corporal del vector y las alteraciones anatomopatológicas asociadas al vector o al transgen expresado.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

La terapia génica *in utero* (TGIU) se realiza mediante la administración de ADN terapéutico en células somáticas tempranas. Dentro de los beneficios reportados hasta la fecha se encuentran la corrección de la disfunción génica temprana (*i.e.* fibrosis quística, distrofia muscular de Duchene, hemofilias, etc.), tratar células blanco inaccesibles en etapas postnatales y de rápida proliferación (tales como células totipotenciales), estudios de respuesta inmunológica (*i.e.* tolerancia inducida hacia el vector o el transgen), estudios de toxicidad y distribución del vector en tejido fetal y estudios de la expresión del transgen en estos tejidos (Lipshutz y cols., 2001; Boyle y cols., 2001; Woo y cols., 1997).

Rojas Martínez (1998) menciona que la vía de administración adenoviral puede influir en la distribución del vector en los tejidos de rata estudiados. Lo anterior es discutido en modelos murinos, en los que no sólo la vía de administración sino que la cantidad de receptores CAR y su localización física en la membrana celular determinan el tropismo adenoviral (Zinn y cols., 1998; Walters y cols., 1999; Wood y cols., 1999).

En el estudio de Larson (Larson y cols., 2000) se reporta la presencia del producto del transgen en circulación sistémica, lo que le permite ser transportado a otros órganos por los que los adenovirus no tienen tropismo, tales como el riñón y la vejiga. Por otra parte, Rossi comenta acerca del potencial transporte o pase de la barrera placentaria por los vectores infundidos y la duración de la expresión del producto del transgen (mayor a 30 días) (Rossi y cols., 2001). Sin embargo, Henning hace hincapié en que no hay presencia de adenovirus en varios tejidos de la madre (útero, hígado, riñones y corazón) al realizarse la detección por PCR después de realizar una transducción intra-hepática *in*

utero en un modelo murino de mucopolisacaridosis (Henning, 2001). Otros tipos de riesgos maternos que pueden surgir son: toxicidad y respuesta inflamatoria al producto del transgen o al adenovirus en sí mismo (Chan y cols., 1999).

Recientemente se ha reportado la presencia del producto del transgen en la sangre de la madre de fetos transducidos con virus asociados a adenovirus en primates no humanos. Sin embargo, el nivel detectado por PCR cuantitativa es de 10 copias del transgen por cada 10,000 copias de beta actina (Lai y cols., 2002).

2.1 Toxicidad Adenoviral

Varios grupos de investigación enfocados en el estudio de los adenovirus reportan que existe un daño potencial debido a la respuesta inflamatoria por la activación de linfocitos T y en menor proporción por linfocitos B, ya sea provocada por las proteínas de la cápside adenoviral o promovida por el producto del transgen acarreado dentro del genoma adenoviral. Adicionalmente, se ha visto que los adenovirus promueven toxicidad al modificar el metabolismo celular e inducir procesos tales como acidosis, lo cual puede asociarse al mal funcionamiento de diversos órganos (NIH Report, 2002; Wells y cols., 2002; Thomas y cols., 2003).

2.2 Toxicidad adenoviral en fetos

Los posibles efectos secundarios a una transducción adenoviral pueden ser efectos teratogénicos, inducción de sepsis, inducción de parto prematuro y activación de reacciones inmunológicas (*i.e.* respuesta inflamatoria, incompatibilidad entre madre e hijo, inducción de anergia). También pueden presentarse casos de neumonía y muerte fetal. De acuerdo a la vía de transducción, podría haber deformaciones fetales por efecto mecánico (lo cual se ha observado ante la pérdida de líquido amniótico y desestabilización de la presión normal en el ambiente fetal). Es importante destacar que la mayoría de estos efectos se observa a altas dosis adenovirales (MacIntyre y cols., 1995; Kim y cols., 1997).

2.3 TGIU en rata

En el laboratorio de terapia génica de la ULIEG del departamento de Bioquímica se inició el estudio de la TGIU en rata y se obtuvieron varios resultados trascendentales para este nuevo estudio. En primer lugar, se observó que la transducción intra-amniótica, con vectores adenovirales no provoca teratogénesis a los 15 d.p.c. a dosis de $1-2 \times 10^{10}$ pv feto. Igualmente, se observó que la madre rata gestante soporta una carga viral de 1×10^{11} pv sin efectos tóxicos aparentes. También se determinó que se pueden transfectar mediante laparotomía un máximo de tres fetos, dado que un número mayor aumenta la tasa de mortalidad materna. Estos autores recomiendan el uso de 100 μ l como volumen máximo a emplear, dependiendo éste del d.p.c en el que se realice la transducción (p. ejem. 10 μ l a los 12 d.p.c.) (Márquez-Lona, 2003).

2.4 Efectos de la TGIU en la rata gestante

En varios comités internacionales y congresos en donde se discute el empleo de la TGIU, se ha establecido que debe monitorearse al menos la sangre materna para considerar el posible paso del vector viral intra-placentario y sus posibles implicaciones histopatológicas en la madre (Reporte del RAC, 1998; Reporte 142, 2000).

Recientemente se reportó que el producto del transgen introducido mediante un virus asociado a adenovirus (AAV, por sus siglas en inglés Adeno-associated virus) por vía intra-hepática al feto, logra detectarse en la sangre de la madre (Lai y cols., 2002). Sin embargo, existen estudios contradictorios en los hallazgos de expresión del transgen en la madre. Estas diferencias podrían deberse a que se emplean diferentes especies, a que se realiza la transducción por diferentes vías y a las diferentes formas en las que se detectan a los genes reporteros empleados (Larson y cols., 2000, Hennig y cols., 2001, Lai y cols., 2002, David y cols., 2003).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de antecedentes relacionados a la toxicidad materna asociada a la transducción adenoviral durante la gestación, en el presente trabajo nos propusimos analizar la toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes. También se propuso determinar la distribución corporal del vector y estudiar las alteraciones anatomopatológicas asociadas a la transducción con el mismo.

CAPÍTULO 4

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos tóxicos en ratas preñadas 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.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar el estado general del modelo animal (peso corporal y temperatura) antes y después de la transducción adenoviral.
- 2.- Valorar los posibles cambios en la función hepática en los grupos animales en estudio (perfil hepático: bilirrubinas totales, AST y ALT).
- 3.- Analizar la distribución del vector en órganos maternos (mediante inmunohistoquímica).
- 4.- Analizar la distribución del producto génico en órganos maternos (mediante inmunohistoquímica).
- 5.- Observar cambios anatomopatológicos en los diferentes órganos en estudio (encéfalo, pulmón, hígado, riñón y sistema reproductor).
- 6.- Correlacionar los hallazgos anatomopatológicos clínicos y de laboratorio.

CAPÍTULO 5

HIPÓTESIS

H₁: La toxicidad debida a la transducción del vector adenoviral en ratas gestantes es mayor en comparación con ratas gestantes inyectadas con el excipiente (PBS).

H₂: La toxicidad debida a la transducción adenoviral es diferente en ratas gestantes comparadas con ratas hembras no gestantes.

CAPÍTULO 6

MATERIAL

Vectores adenovirales de replicación defectuosa.

Los vectores adenovirales empleados en este trabajo no contienen las secuencias correspondientes a E1A y E1B dentro de su genoma, por lo cual son incapaces de replicarse en células no permisivas. Adicionalmente, estos vectores tienen una deleción en el gen E3. Los genes reporteros *gfp* y *lacZ* sustituyen las regiones E1A y E1B adenovirales y son controlados por los siguientes promotores:

- Ad5/RSV-*gfp* (gen de la proteína verde fluorescente) y
- Ad5/CMV-*lacZ* (gen de la β -galactosidasa).

Anestésico.

Se empleó una combinación volumen- volumen 2:1 de ketamina:xilacina administrada por vía IM siendo la dosis administrada igual a 1 μ l/gr de peso. Ketamina (Anesket 1 gr 10 ml), solución inyectable con clorhidrato de ketamina siendo las vías posibles de administración: IM o IV. También se empleó el nombre comercial Ketamina de Cheminova 1.152 gr, equivalente a 1 gr de base, vehículo csp 10 ml. Xilacina (Rompun 25 ml), solución inyectable que se emplea como sedante, analgésico, anestésico y relajante muscular. Cada mililitro contiene: Hidrocloruro de xilazina 20 mg y excipiente 1 ml. Vía de administración: IM

Seda quirúrgica.

Se utilizó seda trenzada estéril de la marca Ethicon 000 con aguja curva de 2.5 cm.

Estuche de grapas para suturar “Autoclip wound closing Kit” (Stoelting 59020).

Este estuche incluye la engrapadora, un removedor y 1000 grapas de 9 mm autoclaveables. Facilita la sutura y disminuye el tiempo de duración de los procesos quirúrgicos. Se utilizó para la sutura de piel del modelo animal empleado en este trabajo.

Colorantes para la tinción de Papanicolaou.

Se emplearon los colorantes H marca Analytyka de Tecnología Industrial Química, S.A. de C.V., Escobedo, N.L.; OG-6 y EA-50 de CTR Scientific, Monterrey, N.L., México.

Parafina (Richard-Allan Scientific).

Se utilizó parafina altamente refinada y con alto contenido de polímeros (punto de fusión 55-57°C). Se empleó tanto en preinclusión como inclusión definitiva en parafina de cada una de las muestras biológicas para la formación de los bloques que permitieron procesar las mismas.

Anticuerpo anti proteína verde fluorescente (Vector BA-0702).

Este anticuerpo se une con alta afinidad a la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*, tanto tipo silvestre, recombinante o cualquier variante.

Anticuerpo anti proteína de la fibra de adenovirus 1,2, 5 y 6 (Chemicon MAB8043).

Este anticuerpo monoclonal murino se une con alta afinidad a la proteína de la fibra de la cápside adenoviral de los serotipos que comprenden al subgrupo C (1, 2, 5 y 6).

Estuche para inmunohistoquímica (Vectastain ELITE ABC kit PK-6102).

Sistema de inmunoperoxidasa ampliamente aceptado por su sensibilidad, economía y confiabilidad. Se emplea en la localización de antígenos presentes en pocas cantidades.

Coloración de las inmunohistoquímicas (Vector DAB substrate kit SK-4100).

Este estuche contiene todos los reactivos necesarios para preparar una solución de trabajo de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) para teñir secciones tisulares con una coloración café.

Portaobjetos.

Para el desarrollo del trabajo se emplearon portaobjetos estándar de 25X75 mm (Corning 2947) y portaobjetos cargados positivamente para una mayor adhesión de los cortes tisulares a los mismos (Daigger G15978Z).

Navajas para micrótopo (TBS 2263 022).

Navajas desechables de acero inoxidable para micrótopo. Se usan para realizar cortes semifinos de muestras tisulares previamente incluidas en parafina.

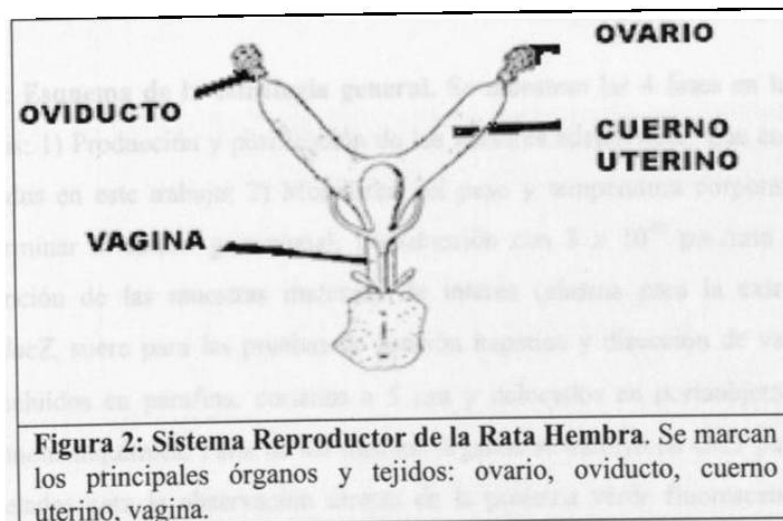
Programas informáticos para el análisis de resultados.

Para el análisis estadístico, se empleó el paquete SPSS v.11.0.

Ratas.



Se emplearon hembras de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa Sprague Dawley, de 12 a 15 semanas de edad y con un peso corporal aproximado entre 200-300 gr (figura 1). Fueron mantenidas con ciclos de luz-oscuridad 12:12 hr, en condiciones de humedad, temperatura y ventilación apropiadas, siendo alimentadas *ad libitum*. Estas ratas se caracterizan por ser fácilmente manipulables en laboratorio, por su gran tasa reproductiva (de 6 a 12 crías por camada) en periodos cortos (20-22 días), por su gran tamaño físico y por su bajo costo. El tipo de placentación es endoteliocorial discoidal (figura 2) (Bivin y cols., 1979; Martínez, 1984).



CAPÍTULO 7

MÉTODOS

7.1 ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS

El esquema planteado para la obtención de resultados se muestra en la figura 3.

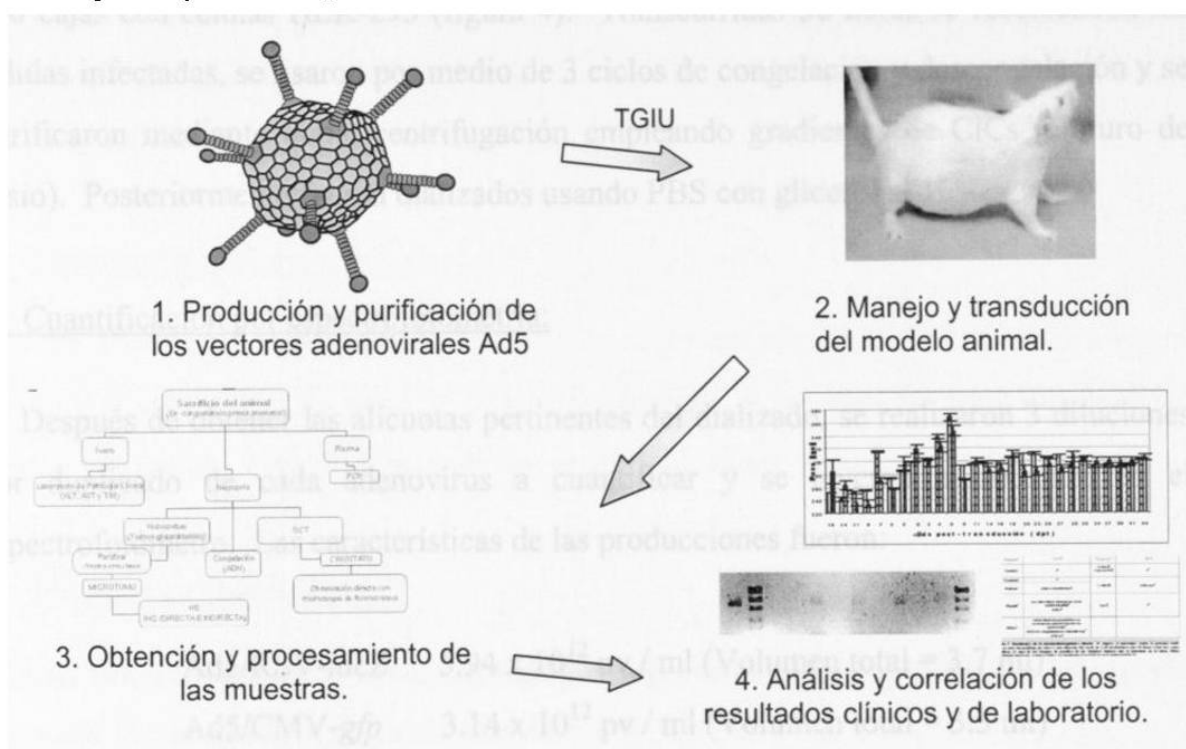


Figura 3: Esquema de la estrategia general. Se muestran las 4 fases en las que se realizó el trabajo de esta tesis: 1) Producción y purificación de los vectores adenovirales que contienen a los genes reporteros empleados en este trabajo; 2) Monitoreo del peso y temperatura corporal, tinción del frotis vaginal para determinar el estado gestacional, transducción con 3×10^{10} p.v. rata a los 15 d.p.c.; 3) Sacrificio y obtención de las muestras maternas de interés (plasma para la extracción de ADN y amplificación de *lacZ*, suero para las pruebas de función hepática y disección de varios órganos. Estos órganos fueron incluidos en parafina, cortados a $5 \mu\text{m}$ y colocados en portaobjetos para su posterior tinción HE e inmunohistoquímica. Parte de los mismos órganos se incluyó en OCT para realizar cortes de los órganos congelados para la observación directa de la proteína verde fluorescente; 4) Se realizó la integración y el análisis de los resultados obtenidos, correlacionando los hallazgos clínicos y de laboratorio.

7.2 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN ADENOVIRAL

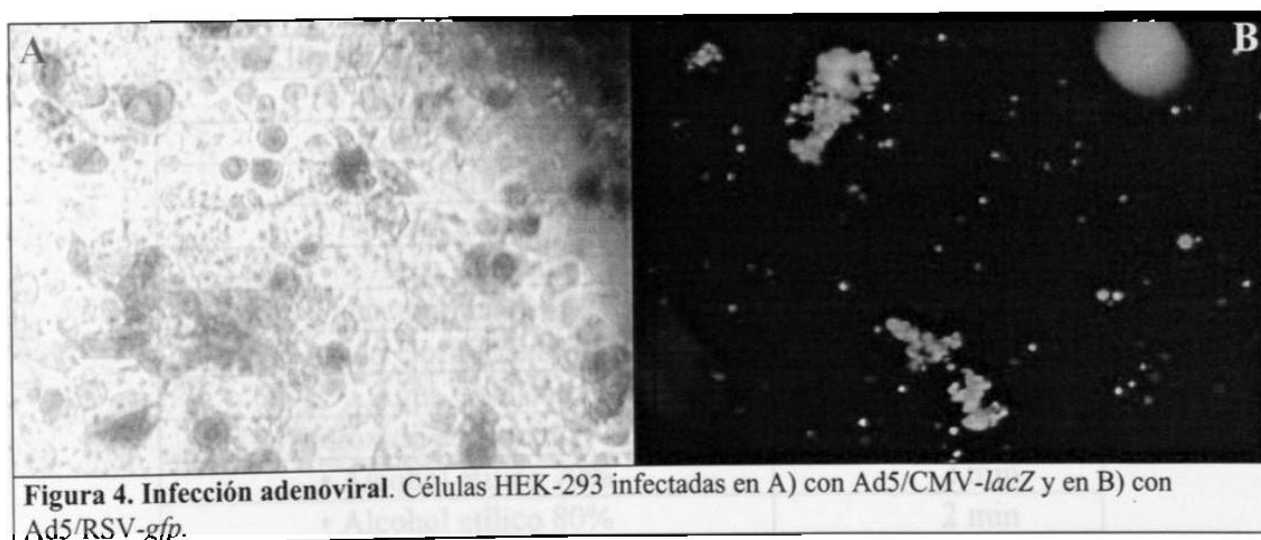
Los vectores adenovirales fueron transfectados en las células HEK-293 que complementan en *trans* los reguladores virales tempranos E1 para permitir su replicación y por ende la producción de partículas adenovirales. Su amplificación se realizó en 35 platos de 150 mm de diámetro con medio DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) preparado con una concentración final del 10% de suero. El concentrado obtenido de esta amplificación se utiliza para realizar la infección de 85-100 cajas con células HEK-293 (figura 4). Transcurridas 36 horas se recolectaron las células infectadas, se lisaron por medio de 3 ciclos de congelación y descongelación y se purificaron mediante doble centrifugación empleando gradientes de CICs (cloruro de cesio). Posteriormente fueron dializados usando PBS con glicerol al 10%.

- Cuantificación por espectrofotometría:

Después de obtener las alícuotas pertinentes del dializado, se realizaron 3 diluciones por duplicado de cada adenovirus a cuantificar y se leyeron a 260 nm en el espectrofotómetro. Las características de las producciones fueron:

Ad5 RSV-*lacZ* 5.94×10^{12} pv / ml (Volumen total = 3.7 ml)

Ad5 CMV-*gfp* 3.14×10^{12} pv / ml (Volumen total = 3.5 ml)



7.3 MODELO ANIMAL

Cada uno de los animales fue marcado mediante la técnica de perforación y muesqueo en el pabellón auricular. Se registraron las variaciones de peso y temperatura corporal.

- Cruzamiento por harén o poligámico

En una jaula de policarbonato se colocaron 5 ratas hembras con 2 machos jóvenes de aproximadamente 500 gr de peso durante una semana, siendo las hembras monitoreadas mediante citología vaginal exfoliativa diaria. Aquellas que se detectaron preñadas fueron movilizadas a otras jaulas (Martínez, 1984).

- Citología vaginal exfoliativa

Para obtener el frotis vaginal se empleó un gotero con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) estéril y se tomó la muestra colocando a las ratas en posición decúbito ventral. El lavado vaginal se extendió en un portaobjetos y fijado mediante calor.

- Técnica de Papanicolaou

Una vez que se tiene el frotis vaginal fijo en el portaobjetos por medio de calor, cada laminilla fue sometida al siguiente tren de coloración (tabla 1):

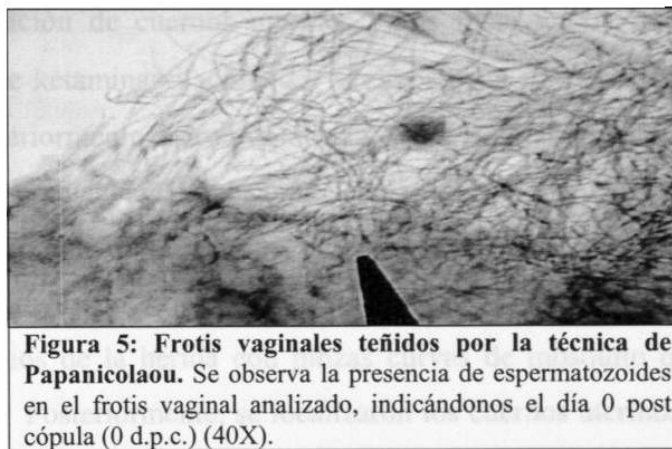
• Alcohol Eter (1:1)	15-20 min.
• Alcohol etílico 96° o	2 min
• Alcohol etílico 80° o	2 min
• Alcohol etílico 70%	2 min
• Agua Corriente	2 min.
• Hematoxilina de Harris	5 min.
• Ácido clorhídrico (0.5° o)	5 seg
• Agua Corriente	30 seg
• Hidróxido de amonio (0.5° o)	30 seg
• Alcohol etílico 70° o	2 min
• Alcohol etílico 80° o	2 min

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez

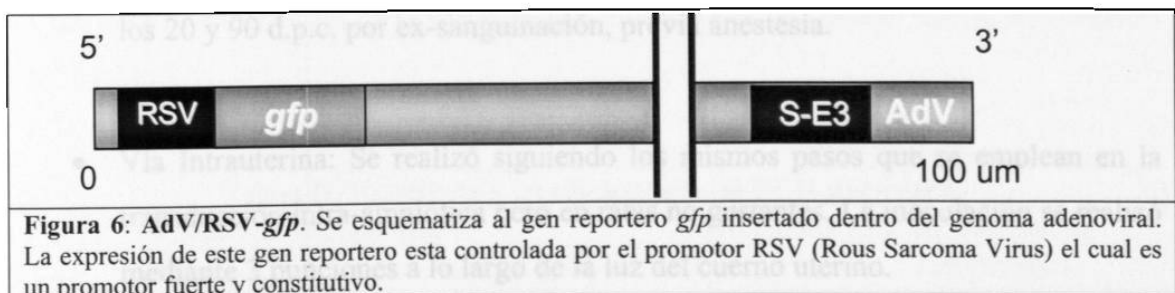
• Alcohol etílico 96%	2 min
• OG 6	4 min
• Alcohol etílico 96%	2 min
• EA 50	3 min
• Alcohol etílico 96%	2 min
• Etanol Absoluto	5 min
• Xileno	5 min.
Montados en resina de bálsamo de Canadá	

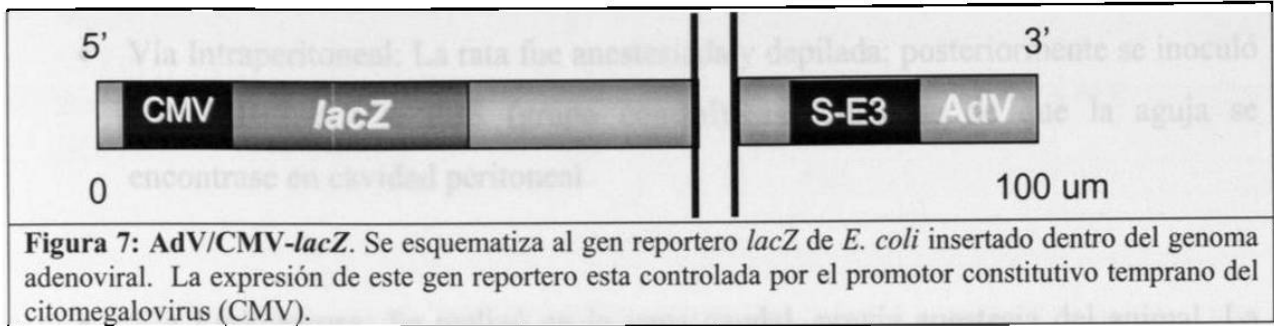
Todo lo anterior permitió determinar el estado de preñez en las ratas (figura 5).



- Transducción adenoviral

Al día 15 d.p.c. se realizó la inyección de los vectores adenovirales que contienen los genes reporteros a emplear en este estudio: Ad5/RSV-*gfp* y Ad5/CMV-*lacZ* (figuras 6 y 7) [Ver Anexo C].





Las vías utilizadas fueron:

- **Vía Intra-amniótica:** Se realizó mediante el proceso quirúrgico de laparotomía con exposición de cuernos uterinos. Las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina:xilacina (2:1 v/v) a 1 µl/gr de peso por vía intramuscular (IM), posteriormente fueron colocadas sobre una tabla con sujetadores laterales para su inmovilización en posición decúbito dorsal. Se realizó asepsia, tricotomía del área abdominal y la posterior antisepsia del área de trabajo. La incisión se realizó a través de la línea blanca, disecándose piel y músculo y separando ambos labios de la herida con pinzas curvas de mosquito que sirvieron como separador. Posteriormente, se localizaron los cuernos uterinos, los cuales fueron expuestos para contabilizar el número de fetos en cada uno de los cuernos y poder tomar la decisión de los 3 fetos_{xA} que recibieron la transducción intra-amniótica con una jeringa de insulina con aguja 29 G x 13 mm. El vector se administró a una dosis de 3×10^{10} p.v/rata. Finalmente se reintrodujeron los órganos expuestos y se suturó la cavidad abdominal utilizando seda quirúrgica 000 mediante la técnica de surjete continuo con candado por planos. La piel se suturó empleando grapas quirúrgicas de 9 mm. Las ratas fueron sacrificadas a los 20 y 90 d.p.c. por ex-sanguinación, previa anestesia.
- **Vía Intrauterina:** Se realizó siguiendo los mismos pasos que se emplean en la transducción intra-amniótica pero en ratas no gestantes. La inoculación se realizó mediante 3 punciones a lo largo de la luz del cuerno uterino.

xA. Siempre se inoculó en el cuerno con mayor cantidad de fetos, buscando inocular aquellos 3 fetos que se ubicasen en la parte central de ese cuerno.

- Vía Intraperitoneal: La rata fue anestesiada y depilada; posteriormente se inoculó con 3×10^{10} p.v. o PBS (grupo control), asegurándose de que la aguja se encontrase en cavidad peritoneal.
- Vía Endovenosa: Se realizó en la vena caudal, previa anestesia del animal. La carga viral fue de 3×10^{10} p.v.t. o PBS (grupo control), usando nuevamente una jeringa de insulina con aguja 29 G. El sacrificio se realizó a los 20 y 60 d.p.c. por ex-sanguinación, previa anestesia.

- Sacrificio

Una vez anestesiada, la rata es sujeta de sus cuatro extremidades a la tabla de cirugía, se incidió en la línea blanca abdominal (tanto en piel como en músculo) y se rechazaron las asas intestinales a la derecha con la finalidad de exponer la arteria aorta abdominal para poder realizar la ex-sanguinación. La sangre se colectó en 2 vacutainers, uno con EDTA y el otro sin anticoagulante. De la madre se disecaron: cerebro, pulmón, hígado, riñón y órganos del sistema reproductor.

7.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Por esta metodología se realizó la amplificación de una secuencia de ADN de 362 pb que incluía al promotor CMV y un fragmento del gen *lacZ*. Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: fcmv 5'CATAGTAACGCCAATAGGGAC3' y rlacz 5'GGTTATTACGACATTTTGGAA3'. Las condiciones de corrida fueron las descritas en la tabla 2.

Reactivos en cada tubo		Condiciones en el termociclador	
Agua mQ	15.58 μ l	Paso	Temperatura
Buffer 10X	2.5 μ l	1	Tiempo
			95°C
			5'

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez

dNTP's	1.1 µl	2	95°C	30''
MgCl ₂	2 µl	3	49°C	1'
TaqPol	0.42 µl	4	72°C	1'
BetaGal1 (forward)	1 µl	5	40 ciclos del paso 2 al 4	
BetaGal2 (reverso)	1 µl	6	72°C	5'
		7	Fin	

De acuerdo a los oligos empleados, la PCR virtual dio la banda esperada ilustrada en la figura 8.

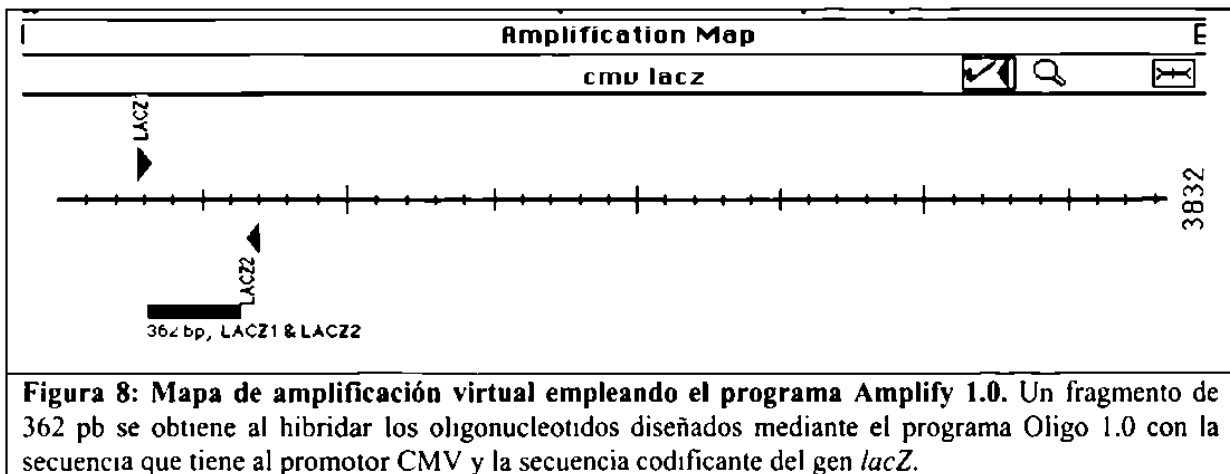


Figura 8: Mapa de amplificación virtual empleando el programa Amplify 1.0. Un fragmento de 362 pb se obtiene al hibridar los oligonucleotidos diseñados mediante el programa Oligo 1.0 con la secuencia que tiene al promotor CMV y la secuencia codificante del gen *lacZ*.

7.5 ANÁLISIS ANATOMOPATOLÓGICO

El material biológico extirpado de las ratas (órganos y tejidos) fue conservado en formol al 4% y glutaraldehído al 1.2% en buffer de fosfatos (PBS) 0.9% solución salina (KCl 3.75 mM, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH = 7.4). Los órganos de la madre fueron disecados sagital y coronalmente.

El proceso de inclusión en parafina se llevó a cabo por encapsulación en histosette I manteniéndose en la misma solución de formol al 4% y glutaraldehído al 1.2% en PBS. Las muestras fueron incluidas en parafina pasando por formol, acetona en concentraciones crecientes, xileno y finalmente dos baños de parafina. Los bloques de parafina sólida fueron preparados mediante un dispensador de parafina. De cada muestra se realizaron 5 cortes de un grosor de 5 micrómetros con micrótopo, extendidos en un

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez

baño de flotación de tejido a 50 °C y montados en portaobjetos de 25 x 75 mm (3 de estos cortes fueron montados en laminillas superfrost cargadas positivamente para la realización de los estudios de inmunohistoquímica; los 2 restantes fueron para comparar entre daño y/o malformación asociada a la presencia del vector adenoviral, por medio de la tinción HE).

- Tinción con hematoxilina y eosina

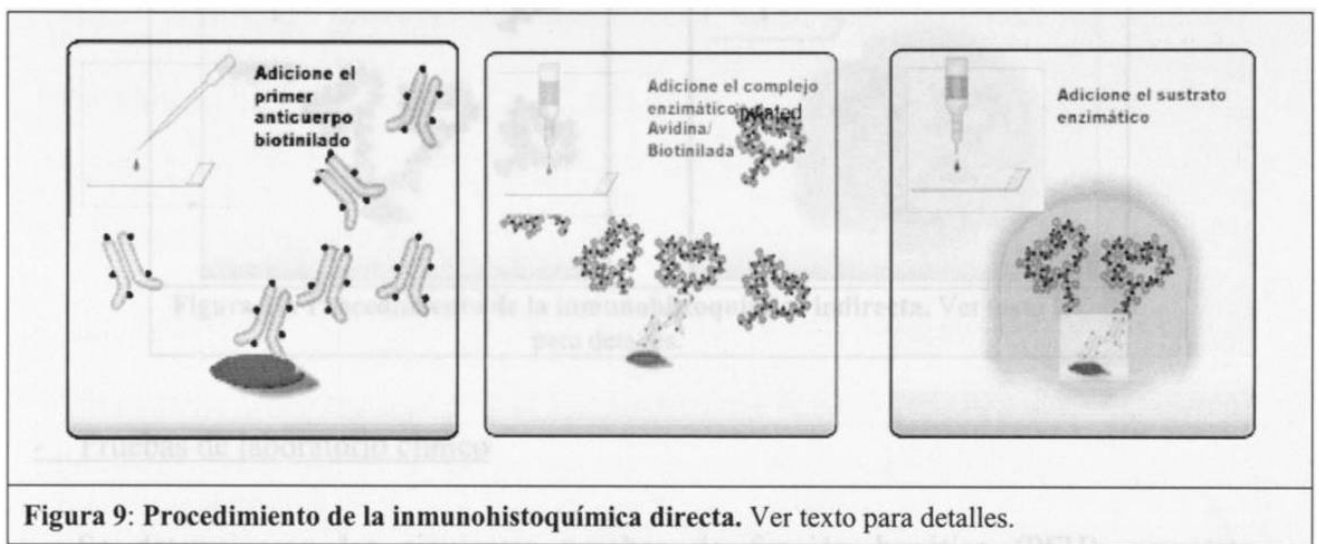
Una vez montados los cortes en portaobjetos fueron desparafinizados e hidratados; posteriormente se siguió el protocolo de la tabla III.

Hematoxilina	2'
H2O enjuagar	1' (lento 1')
HCl 0.5%	10''
H2O enjuagar	2 lavados
Agua amoniacal 0.5%	10''
H2O enjuagar	2 lavados
H2O enjuagar	2 lavados
Eosina	6 Tiempos
EtOH 96%	10''
EtOH 96%	1'
EtOH 100%	2'
EtOH-Xilol	3'
Xilol	5'
Resina sintética Entallán para montar el cubre-objetos en la laminilla.	

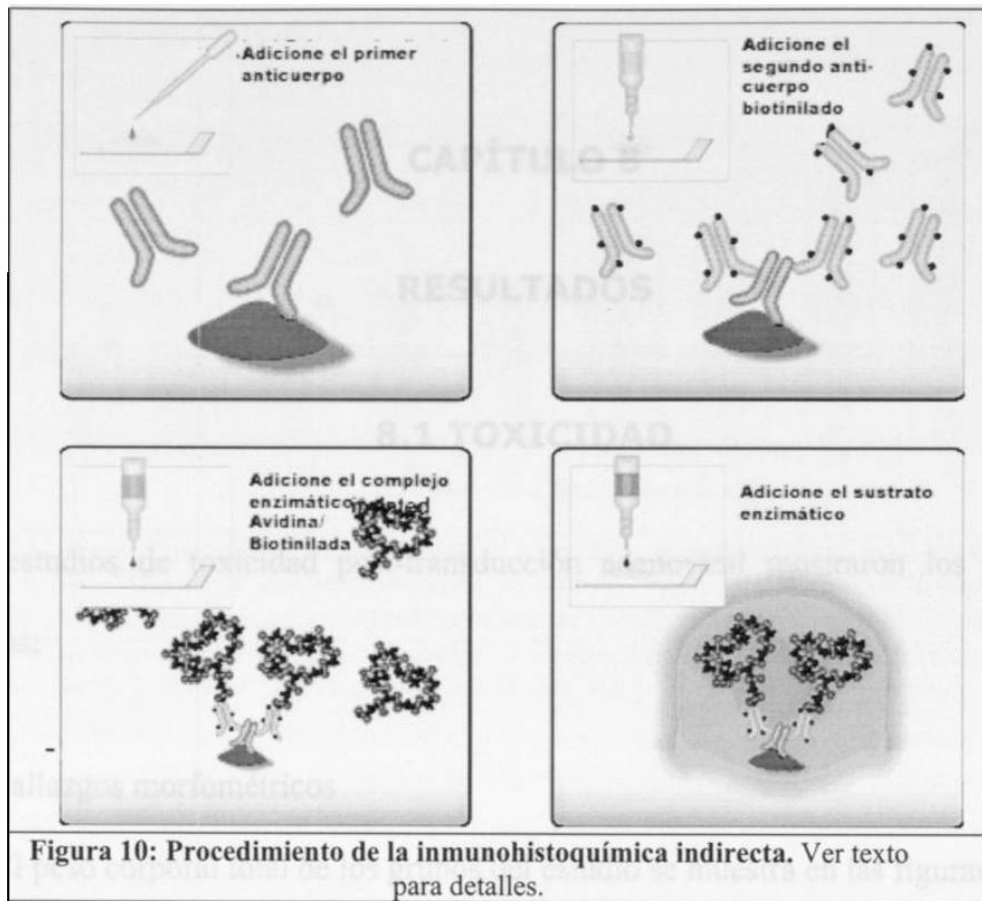
- Inmunohistoquímica

- *Directa.* Para realizar el análisis inmunohistoquímico se desparafinizaron e hidrataron las muestras. Estas fueron sometidas a recuperación antigénica con buffer de citratos (pH 6) y la actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada lavando las laminillas en peróxido de hidrógeno (3%) en metanol por espacio de 30 min para su posterior inmersión en PBS con Tritón X-100 (0.1%). Posteriormente, se colocaron las laminillas en una cámara húmeda para los siguientes procedimientos. Se bloquearon las

IgGs y proteínas de las muestras mediante su incubación con suero normal de caballo diluido de acuerdo al instructivo del estuche comercial empleado; se realizó la incubación con el anticuerpo biotinilado, se lavó con PBS, se les agregó el complejo ABC del kit VECTOR (pk-6102). Transcurrido el tiempo de incubación (30 min) se lavaron las laminillas y se expusieron a diaminobenzidina (sustrato de la peroxidasa) por un tiempo máximo de 10 minutos, de acuerdo a la intensidad deseada del colorante. Se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con la resina sintética Entellan (figura 9).



- *Indirecta*. Las muestras fueron procesadas de la misma manera que en la inmunohistoquímica directa excepto que antes de la incubación con el anticuerpo biotinilado (en este caso un anticuerpo IgG de ratón), se realizó su incubación con el anticuerpo primario contra la proteína de la fibra de la cápside adenoviral de la subclase C (figura 10).



- Pruebas de laboratorio clínico

Se determinaron las siguientes pruebas de función hepática (PFH): aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y bilirrubinas totales para vigilar la aparición de hepatotoxicidad.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1 TOXICIDAD

Los estudios de toxicidad post-transducción adenoviral mostraron los siguientes resultados:

8.1.1 Hallazgos morfométricos

El peso corporal total de los grupos del estudio se muestra en las figuras 11 y 12.

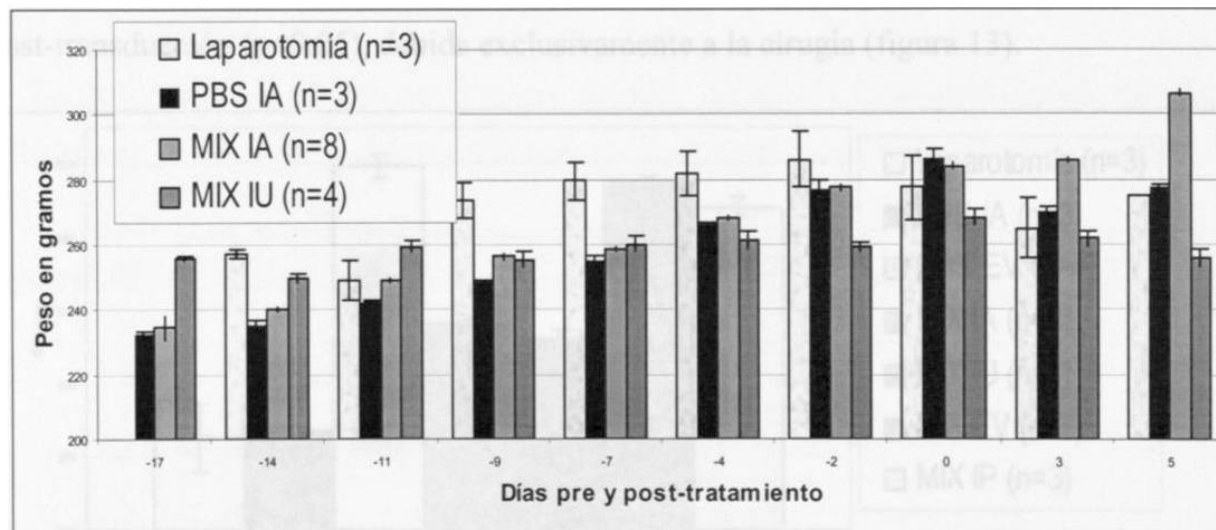


Figura 11: Peso de ratas con cirugía. Se grafica la media \pm error estándar de los grupos de ratas sometidas sólo al procedimiento de laparotomía y aquellas transducidas con PBS siendo ratas gestantes (PBS IA) conformando los grupos control. La tercer columna (MIX IA) representa a ratas gestantes transducidas con la mezcla adenoviral de los vectores empleados en este estudio (Ad5/RSV-*gfp* y Ad5/CMV-*lacZ*) y la cuarta columna (MIX IU) son ratas no gestantes transducidas con la misma mezcla de vectores adenovirales. Se contemplan días pre-tratamiento y días post-tratamiento (d.p.t.), siendo el máximo observado el día 5 d.p.t. La n representa el número de muestras por grupo.

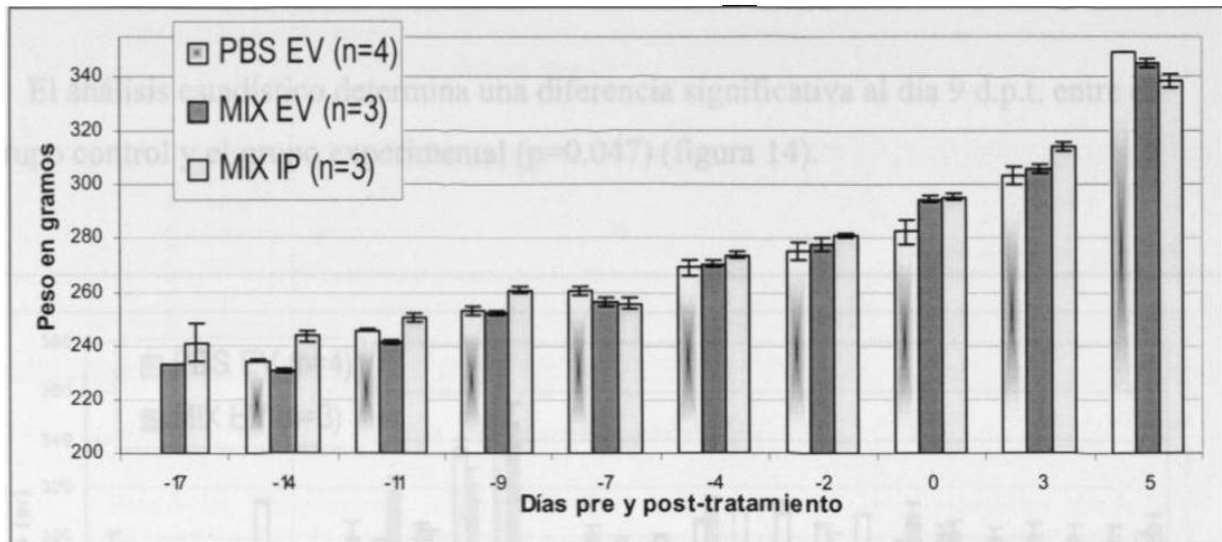


Figura 12: Peso de ratas sin cirugía. Se gráfica la media \pm error estándar del peso corporal de ratas gestantes transducidas por vías independientes de cirugía: endovenosa tanto con buffer de fosfatos (PBS EV) conformando el grupo control como con la mezcla adenoviral (MIX EV) y transducción intraperitoneal con la misma mezcla adenoviral (MIX IP). Se contemplan días pre-tratamiento y días post-tratamiento (d.p.t.), siendo el máximo observado el día 5 d.p.t. La n representa el número de muestras por grupo.

Se observa un aumento progresivo en el peso del grupo de ratas no operadas con mayor variabilidad al compararse con las ratas operadas. El análisis estadístico entre estos dos grupos (con y sin operación) demostró una diferencia significativa al día 5 post-transducción ($p < 0.05$), debida exclusivamente a la cirugía (figura 13).

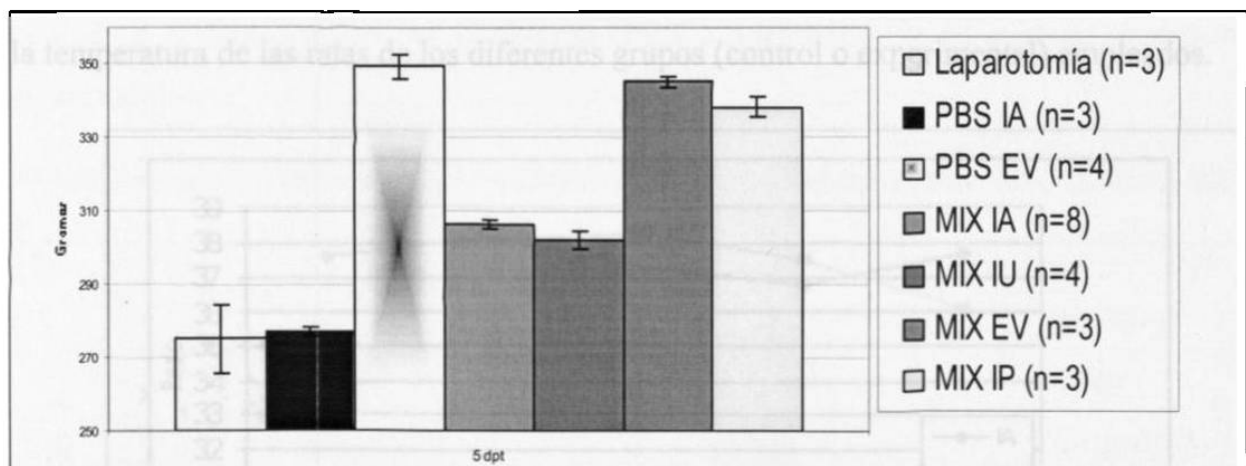


Figura 13: Peso corporal al día 5 post-tratamiento (5 d.p.t.). Las primeras 3 columnas representan la media aritmética de los grupos controles siendo la primer columna el grupo de ratas no gestantes sometidas a laparotomía, la segunda columna el grupo de ratas gestantes con laparotomía e inyectadas con PBS en 3 de sus fetos (PBS IA), la tercer columna es el grupo de ratas gestantes inyectadas con PBS por vía endovenosa (PBS EV). Las cuatro columnas finales representan a los grupos transducidos con la mezcla adenoviral mediante las siguientes vías: intra-amniótica (MIX IA), intra-uterina (MIX IU), endovenosa (MIX EV) e intraperitoneal (MIX IP). Las barras en cada columna demuestran los errores estándares de las muestras. Se nota claramente la diferencia estadística entre los grupos de acuerdo a la vía empleada. No hay diferencias entre ratas gestantes (MIX IA) y no gestantes (MIX IU). La n representa el número de muestras por grupo.

El análisis estadístico determina una diferencia significativa al día 9 d.p.t. entre el grupo control y el grupo experimental ($p=0.047$) (figura 14).

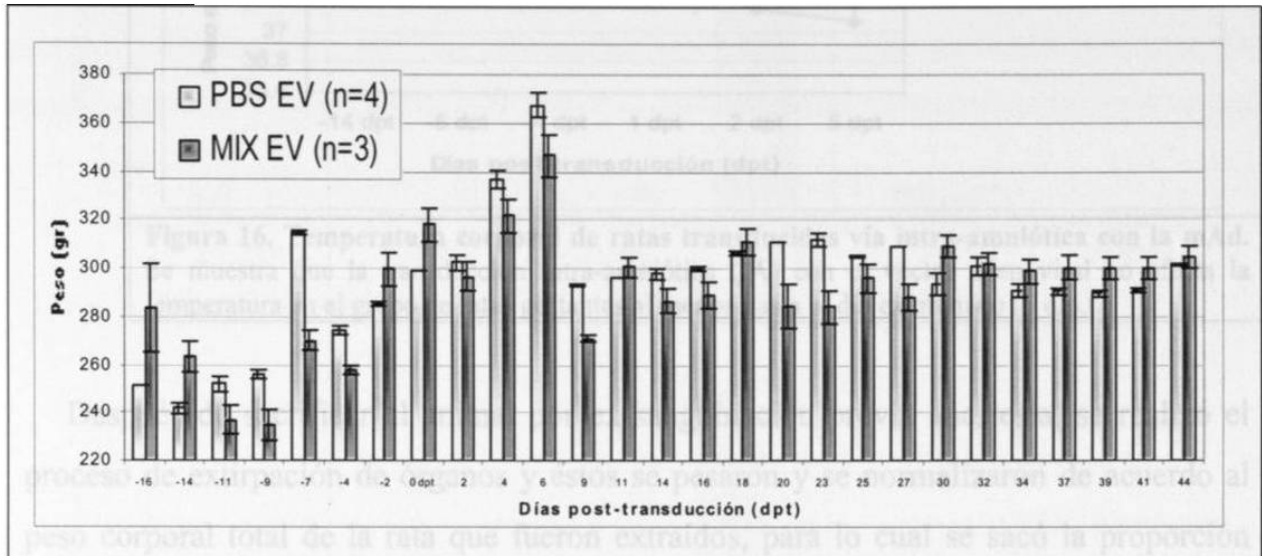


Figura 14: Peso corporal total en grupos a largo plazo. Se observó la media y error estándar de ratas gestantes transducidas con la mezcla adenoviral (columna fucsia) o inyectadas con PBS (columna con centro azul). La n representa el número de muestras por grupo.

En las figuras 15 y 16, se observó que no hubo diferencia estadística significativa en la temperatura de las ratas de los diferentes grupos (control o experimental) empleados.

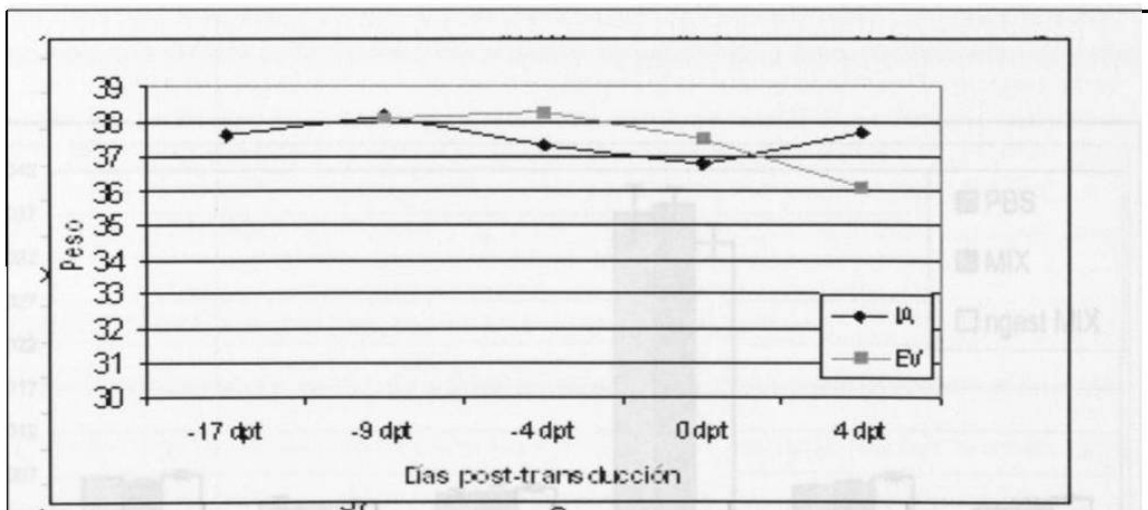


Figura 15: Temperatura corporal en grupos control. No existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de rata inyectados con PBS (independientemente de la vía empleada) hasta el día examinado (4 d.p.t.). $n=3$

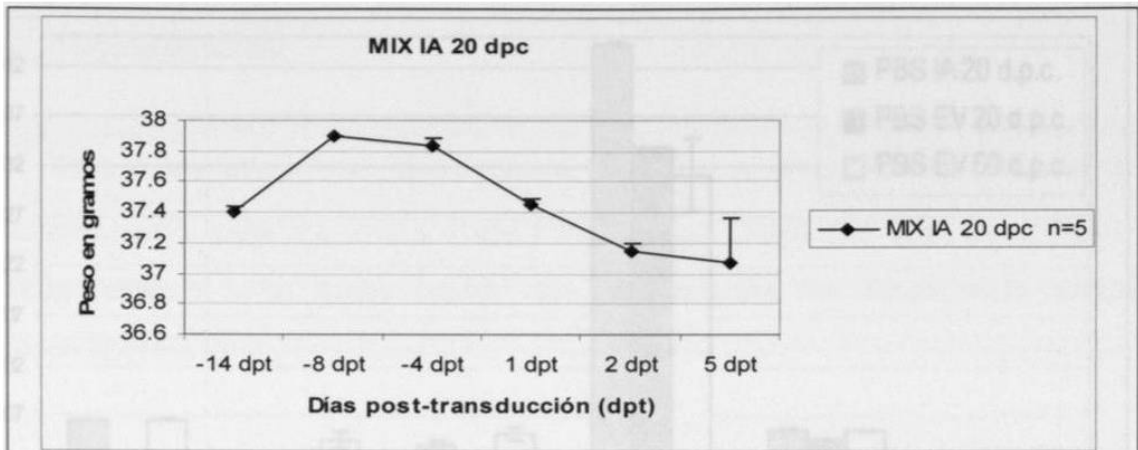
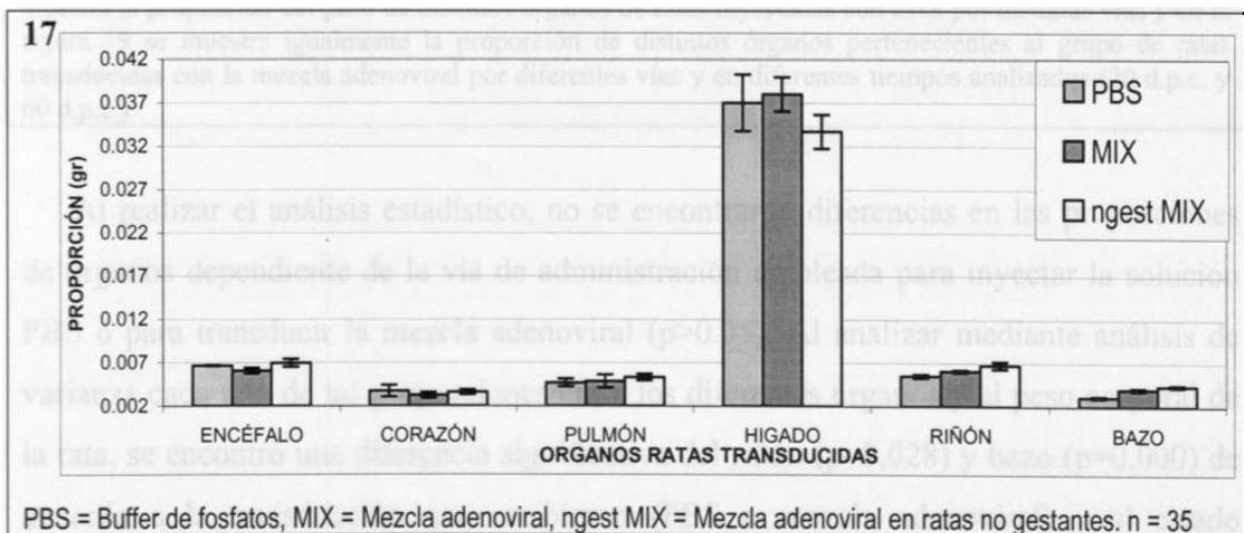
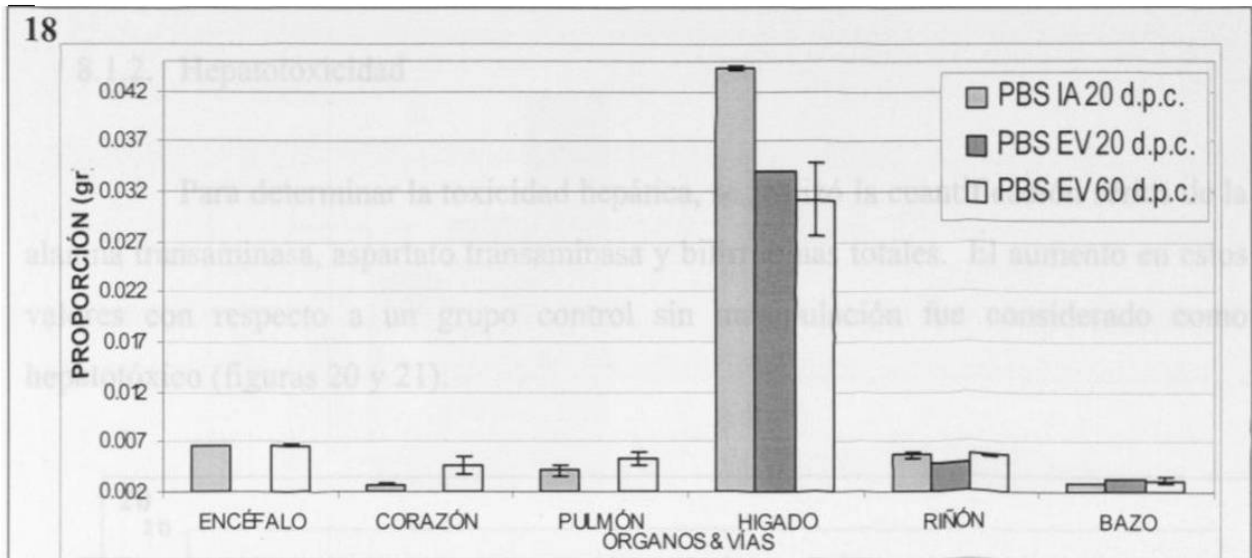


Figura 16. Temperatura corporal de ratas transducidas vía intra-amniótica con la mAd. Se muestra que la transducción intra-amniótica (IA) con el vector adenoviral no afecta la temperatura en el grupo de ratas gestantes al menos hasta el día examinado (5 d.p.t.).

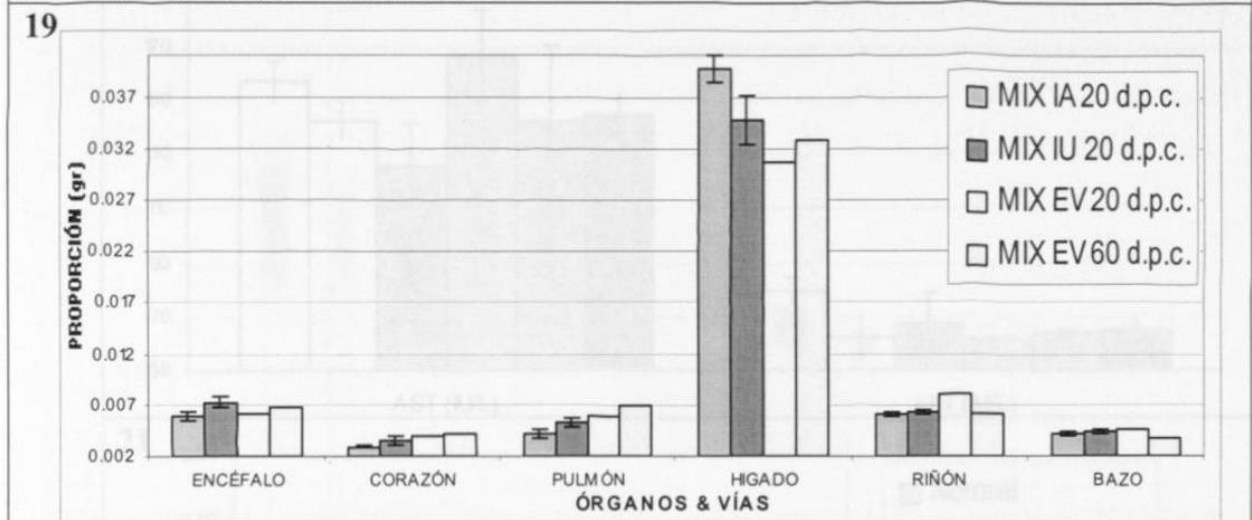
Después de sacrificar al animal por ex-sanguinación previa anestesia, se realizó el proceso de extirpación de órganos y éstos se pesaron y se normalizaron de acuerdo al peso corporal total de la rata que fueron extraídos, para lo cual se sacó la proporción entre el peso del órgano y el peso corporal total. Se graficaron estas proporciones de acuerdo al tratamiento recibido (PBS o mezcla adenoviral) y al estado gestacional (figuras 17, 18 y 19). Después de realizar el análisis estadístico correspondiente, se encontró una diferencia significativa en el peso del riñón ($p=0.028$) y bazo ($p=0.000$), de acuerdo a la transducción que recibieron (PBS o adenovirus) y de acuerdo al estado gestacional.



PBS = Buffer de fosfatos, MIX = Mezcla adenoviral, ngest MIX = Mezcla adenoviral en ratas no gestantes. n = 35



IA= vía intra-amniótica, EV = endovenosa. n=8



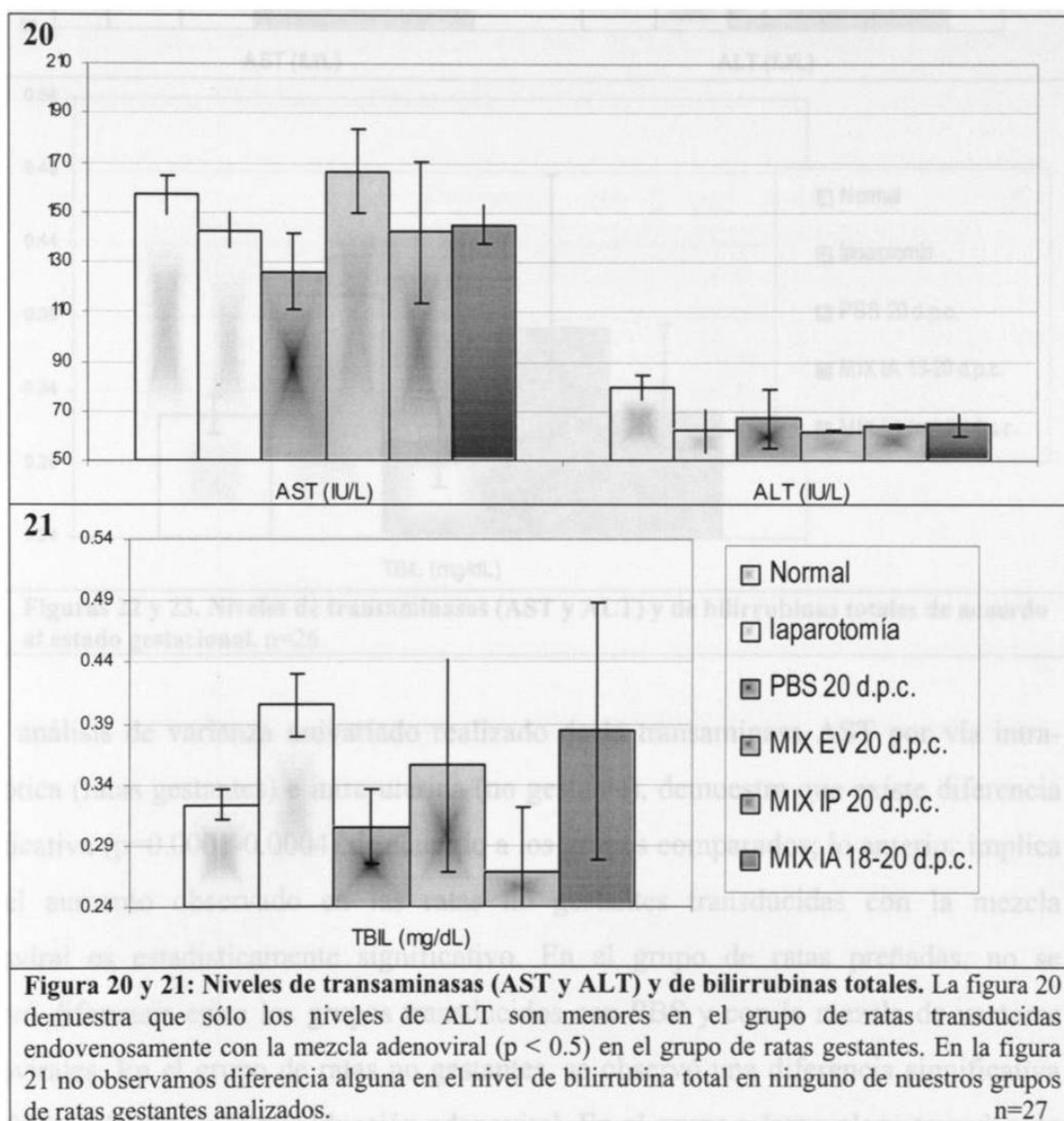
IA= intra-amniótica (gest), IU= intra-uterina (ngest), EV = endovenosa (gest). n=17

Figura 17, 18 y 19: Proporción del peso del órgano entre el peso corporal total. En la figura 17 se observó la proporción de distintos órganos en base al tratamiento recibido por la rata: inyección con PBS o transducción con la mezcla adenoviral en ratas gestantes (columna azul y vino, respectivamente) y del grupo de ratas no gestantes transducidas con la mezcla adenoviral (columna amarilla). En la figura 18, se muestra la proporción del peso de distintos órganos de ratas inyectadas con PBS por distintas vías y en la figura 19 se muestra igualmente la proporción de distintos órganos pertenecientes al grupo de ratas transducidas con la mezcla adenoviral por diferentes vías y en diferentes tiempos analizados (20 d.p.c. y 60 d.p.c.).

Al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias en las proporciones de órganos dependiente de la vía de administración empleada para inyectar la solución PBS o para transducir la mezcla adenoviral ($p > 0.05$). Al analizar mediante análisis de varianza cada uno de las proporciones entre los diferentes órganos y el peso corporal de la rata, se encontró una diferencia significativa del riñón ($p = 0.028$) y bazo ($p = 0.000$) de acuerdo a la transducción que recibieron (PBS o mezcla adenoviral) y al estado gestacional.

8.1.2. Hepatotoxicidad

Para determinar la toxicidad hepática, se realizó la cuantificación sérica de la alanina transaminasa, aspartato transaminasa y bilirrubinas totales. El aumento en estos valores con respecto a un grupo control sin manipulación fue considerado como hepatotóxico (figuras 20 y 21).



Dado que los parámetros bioquímicos varían de acuerdo al estado gestacional, comparamos ratas no gestantes con ratas gestantes transducidas con la mezcla adenoviral (figuras 22 y 23).