

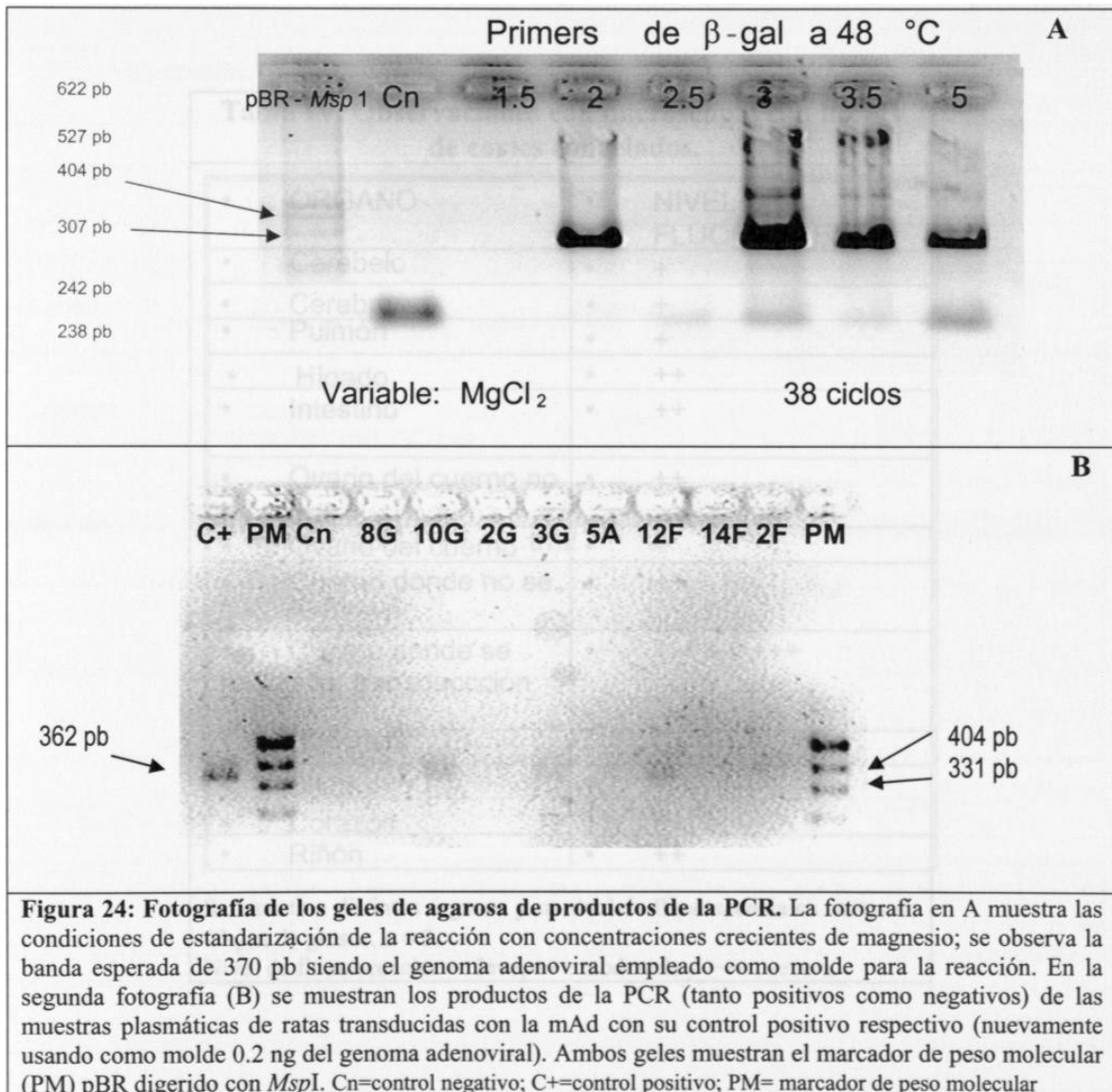
El análisis de varianza univariado realizado de la transaminasa AST por vía intra-amniótica (ratas gestantes) e intra-uterina (no gestante), demuestra que existe diferencia significativa ( $p=0.0001-0.0004$ ) de acuerdo a los grupos comparados; lo anterior implica que el aumento observado en las ratas no gestantes transducidas con la mezcla adenoviral es estadísticamente significativo. En el grupo de ratas preñadas, no se observó diferencia entre los grupos transducidos con PBS y con la mezcla de vectores adenovirales. En el grupo de ratas no gestantes, se observó una diferencia significativa ( $p=0.005$ ) atribuible a la transducción adenoviral. En el grupo a largo plazo transducido por vía endovenosa con la mezcla adenoviral o inyectado con buffer de fosfatos, no se encontró diferencia significativa ( $p = 0.064$ ) entre los grupos; tampoco hubo diferencia

significativa relacionada al tiempo o periodo en el que se tomó la muestra (5 o 45 días post-transducción).

## 8.2 BIODISTRIBUCIÓN

### 8.2.1 Amplificación de ADN (de plasma) mediante PCR

Para determinar la distribución tisular del adenovirus, se realizó la amplificación del ADN plasmático de las ratas usadas en este estudio. El fragmento a amplificar contuvo la secuencia CMV-*lacZ* (figura 24).



Se realizó la estandarización de las condiciones óptimas (de acuerdo a los oligos usados) para la PCR (figura 24A). Se obtuvo que el 30% de las muestras de las ratas transducidas por vía intra-amniótica e intra-uterina (ratas gestantes y no gestantes, respectivamente) fueron positivos; mientras que el 50% de las ratas gestantes transducidas por vía endovenosa fue igualmente positivo (figura 24B).

### 8.2.2 Observación directa de cortes en criostato

En la tabla IV, se muestran los resultados obtenidos de cortes realizados con criostato de diferentes órganos obtenidos de ratas transducidas con la mezcla adenoviral (Ad5 *gfp-lacZ*) por la vía intra-amniótica (figura 25).

<b>Tabla IV. Observaciones con microscopio con luz UV de cortes congelados.</b>	
<b>• ORGANO</b>	<b>• NIVEL DE FLUORESCENCIA</b>
• Cerebelo	• +
• Cerebro	• +
• Pulmón	• +
• Hígado	• ++
• Intestino	• ++
• Ovario del cuerno no trnx	• ++
• Ovario del cuerno trnx	• +
• Cuerno donde no se transdujo	• ++
• Cuerno donde se realizo la transduccion	• +, ++ y +++
• Páncreas	• ++
• Bazo	• +
• Corazón	• +
• Rinon	• ++

Se muestran distintos órganos y su nivel de fluorescencia en cortes de 20 µm de grosor. n = 3.  
Nivel de fluorescencia: + : leve, ++ : moderada y +++ : severa.

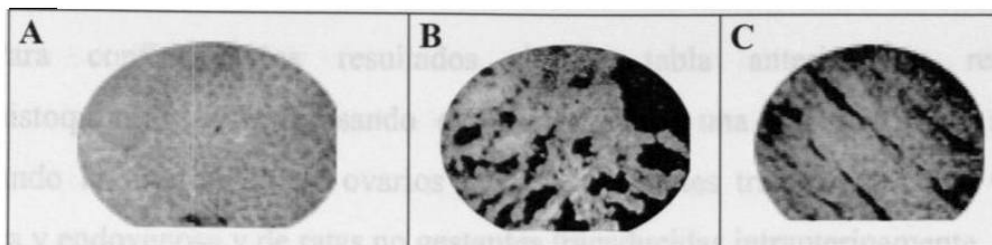


Figura 25: Fotografías tomadas de cortes realizados en criostato observados con microscopio con luz UV. Se muestran cortes de 20 µm de grosor vistos con un aumento 20X.. A) Hígado; B) Pulmón y C) Cuerno Uterino.

### 8.2.3 Inmunohistoquímica

#### 8.2.3.1 Indirecta (Anti-adenovirus serotipo 5)

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.

**Tabla V. Resultados de la inmunohistoquímica indirecta.**

Órganos	AdV	Órganos	AdV
Cerebro	+++ diseminada tanto citoplasma como nuclear	Sistema Reproductor	+ a ++ ovarios y mucosa de cuerno uterino (IA, IU, EV)
Cerebelo	de +++ a + (+++capa granulosa y P, ++capa molecular y + sust. Blanca)	Corazón	(IA) +++ (EV) ++
Pulmón	(IU) +++ (IA 7) ++ a nivel de citoplasma; señal diseminada (EV) ++	Bazo	++ distribuido a lo ancho del órgano
Hígado	(IU) +++ (EV) +++ (IA IPng) ++ Señal tenue a nivel de citoplasma y > + nuclear a nivel de espacio porta en comparación con el espacio centrolobulillar	Otros Intestino	++
Riñón	(IU) +++ (EV)++ en epitelio tubular	Páncreas	++

Se empleó un anticuerpo que reconoce la fibra adenoviral del serotipo 5 con una dilución a 1:1200 incubándose por 24 horas sobre cortes de 5 µm de grosor provenientes de bloques de parafina de los diferentes órganos que se muestran en la tabla. Nivel de detección: + leve (<30%), ++ moderada (30-80%) y +++ severa (>80%).

Para confirmar los resultados de la tabla anterior, se realizó la inmunohistoquímica anterior usando el anticuerpo en una dilución igual a 1=800, confirmando la positividad en ovarios de ratas gestantes transducidas por vía intra-amniótica y endovenosa y de ratas no gestantes transducidas intrauterinamente.

También se encontró positividad de sistema reproductor de crías provenientes de ratas transducidas por vías endovenosa e intra peritoneal evaluadas a los 14 d.p.t. en la rata madre (7 días post nacimiento de las ratas crías).

8.2.3.2 Directa (Anti-proteína verde fluorescente).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla VI.

**Tabla VI. Resultados de la inmunohistoquímica directa.**

Órganos	GFP	Órganos	GFP
Cerebro	+	Sistema Reproductor	+
Cerebelo	+	Corazón	(IA) +++
Pulmón	(IA) + citoplásmico		
Hígado	+++ discreta a intensa en zona centrolobulillar (IA) +	Bazo	+
Riñón	Señal intensa (citoplásmico y nuclear) en epitelio tubular no glomerular. (IU) +++ citoplasma en cápsula sup. (IA) ++		

Se emplea el anticuerpo desarrollado en cabra contra la proteína verde fluorescente (GFP) a una dilucion del stock de 1:50 incubándose por 48 horas sobre los cortes semifinos (5 µm) de los bloques de parafina de los distintos organos que se muestran en la tabla. Nivel positividad detectado: + leve (<30%), ++ moderada (30-80%) y +++ severa (>80%).

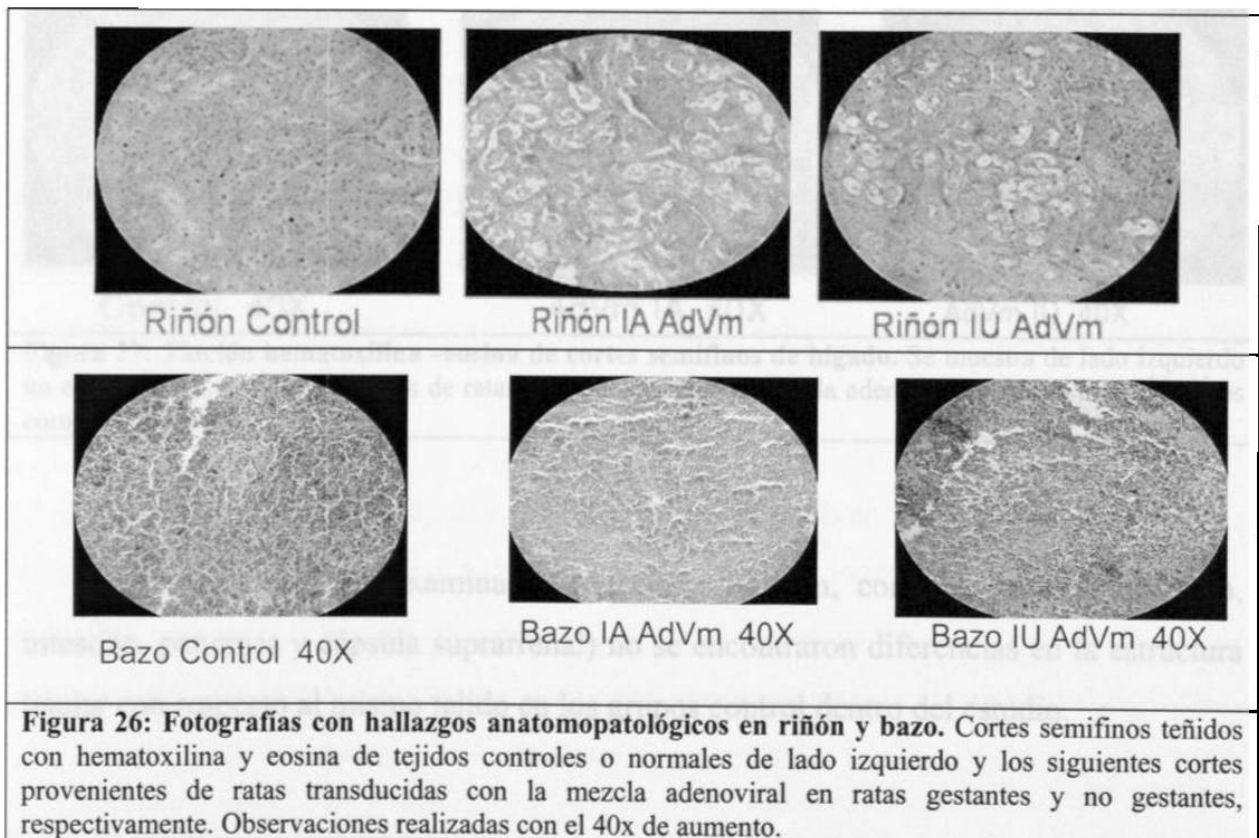
De los resultados de la tabla anterior, se deduce que la expresión o presencia de la proteína GFP fue mayor en hígado, corazón y riñón. Lo anterior es atribuible al gran tropismo adenoviral existente en estos órganos.

### 8.3 Hallazgos anatomopatológicos

El bazo y el riñón se encontraron aumentados en peso en los animales transducidos con la mezcla adenoviral de forma significativamente diferente en el grupo de ratas no gestantes en comparación con el grupo de ratas gestantes inyectadas con PBS y en el caso del bazo, la diferencia estuvo dada principalmente por el estado gestacional independiente de la transducción.

Los daños encontrados en estos órganos se muestran en la figura 26.

- Riñón: Desorganización de la estructura tubular, necrosis de túbulo proximales y congestión glomerular;
- Bazo: Congestión sinusoidal y monoclonalidad celular.

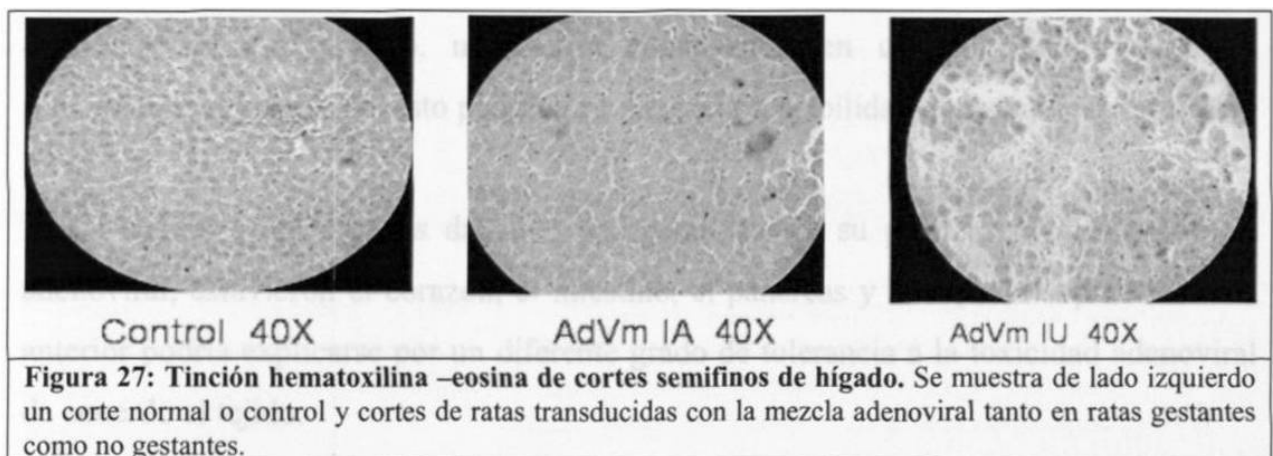


Estos hallazgos fueron severos cuando la transducción adenoviral se realizó mediante laparotomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos (tanto en ratas gestantes como no gestantes), necrosis tubular leve (riñón), sinusoides conservados y congestión leve (bazo) cuando se realizó la transducción vía endovenosa e intra peritoneal (tanto en ratas gestantes como no gestantes).

En cambio, en hígado (figura 27) se encontró daño principalmente en el grupo de ratas no gestantes del siguiente tipo:

- Daño leve a nulo en ratas gestantes transducidas con AdV (i.e. fenómenos focales de regeneración hepática).

- Daño importante o severo en ratas no gestantes transducidas con AdV (i.e. esteatosis micro y macrovesicular periportal; necrosis hepática submasiva e infiltrado linfocitario periportal y sinusoidal).



En otros órganos examinados (encéfalo, pulmón, corazón, músculo estriado, intestino, páncreas y cápsula suprarrenal) no se encontraron diferencias en la estructura tisular con respecto al mismo tejido en los grupos control dentro del estudio.

## **CAPÍTULO 9**

### **DISCUSIÓN**

A pesar de que en la literatura se menciona que del 90 al 95 % del transgen expresado después de la transducción endovenosa en modelos murinos se detecta en los hepatocitos, existe una heterogeneidad no sólo de acuerdo al modelo de roedor (rata o ratón), sino que también de acuerdo a la cepa dentro de la especie en estudio (Lefesvre y cols., 2003). En este trabajo se observó que el vector se disemina a otros órganos de la rata (*i.e.* encéfalo, pulmón, riñón, corazón, bazo, intestino y páncreas). Lo anterior coincide con reportes previos en la literatura (Zinn y cols., 1998).

Los niveles de expresión de la proteína GFP captados por la inmunohistoquímica y la observación directa al microscopio con luz UV, de las laminillas con cortes tisulares obtenidos en este trabajo, no fueron coincidentes en corazón, bazo y aparato reproductor; sin embargo, ésto podría atribuirse a la sensibilidad de la técnica empleada.

En cuanto a los órganos dañados, independiente de su positividad a la presencia adenoviral, estuvieron el corazón, el intestino, el páncreas y la cápsula suprarrenal. Lo anterior podría explicarse por un diferente grado de tolerancia a la toxicidad adenoviral de acuerdo al tejido.

El daño a bazo y riñón coincide con su aumento de peso en los animales transducidos con la mezcla adenoviral (*Ad5/gfp-lacZ*), tanto en ratas gestantes como no gestantes; mientras que daño a hígado de moderado a severo se identificó sólo en aquellas ratas transducidas con la mezcla adenoviral en estado no gestante. Analizando el daño a estos mismos órganos en ratas gestantes se observó que el daño fue decreciendo según la vía



de administración en el siguiente orden: vía intra-amniótica, endovenosa e intra-peritoneal.

El nivel elevado de AST en las ratas no gestantes transducidas intrauterinamente con la mezcla adenoviral con respecto a las ratas control y a las ratas gestantes transducidas con la mezcla adenoviral, implica que el microambiente en el estado gestacional (hormonas, sistema inmunológico, etc.) atenúa el daño hepatotóxico en ratas gestantes, mientras que en las no gestantes el daño no es atenuado por estos mismos factores. Al respecto, Snyder atribuye la producción de interleucinas como IL-10, IL-6 y TGF- $\beta$ 1 a glicoproteínas gestacionales que podrían contribuir a atenuar la respuesta inmune en contra del adenovirus (Snyder y cols., 2001) (tabla VII).

<b>Tabla VII. Función efectora de citocinas.</b>		
<b>CITOCINA</b>	<b>FUENTE</b>	<b>FUNCIÓN EFECTORA</b>
IL-6	Linfocitos T CD4+, Macrófagos, Células cebadas, Fibroblastos	Crecimiento y diferenciación de células efectoras T y B, y precursores hematopoyéticos. Inducción de proteínas de fase aguda.
IL-10	Linfocitos T CD4+, Linfocitos B, Macrófagos	Inhibe la secreción de IFN $\gamma$ Inhibe inflamación por células mono nucleares
TGF- $\beta$ 1	Linfocitos T y B	Inhibición de la hematopoyesis fomentada por IL-3+CSF
IFN $\gamma$	Linfocitos T	Anti-viral; activación de macrófagos; Expresión del MHC de clase I y II en macrófagos y otros tipos celulares; Diferenciación de linfocitos T citotóxicos; Síntesis de IgG2a por linfocitos B activados; Antagonista de varias acciones de IL4.
IL-4	Linfocitos T CD4+, células cebadas y estroma de médula ósea	Activación de la proliferación de linfocitos T, células cebadas y precursores hematopoyéticos. Inducción de MCH clase II y PC $\epsilon$ R en células B; p75 IL2R en células T; switch o cambio de isotipos IgG1 e IgE.

Modificado de Tabla 10.1. p 175. Roitt I. 1994 "Essential Immunology" 8th Edition. Editorial: Blackwell Science.

Al igual que en reportes previos, no se encontró daño o alteración física en el modelo animal empleado durante este estudio. Adicionalmente, no se observó hepatotoxicidad en las ratas gestantes transducidas con la mezcla adenoviral (Ad5/gfp-lacZ).

## **CAPÍTULO 10**

### **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se observó una menor recuperación en peso corporal de aquellas ratas cuya manipulación requirió de laparotomía exploratoria con exposición de los cuernos uterinos a los 5 días post operatorio examinado en comparación con aquellas ratas cuya manipulación no involucró una cirugía. Se encontró que en los grupos a largo plazo, sólo hubo diferencia significativa entre grupo control y experimental a los 9 d.p.t., no observándose ésta a mayor tiempo (hasta 45 d.p.t.). En cuanto a la temperatura, ésta no varió a lo largo del estado gestacional, ni se modificó por la transducción adenoviral o la inyección de PBS por las diferentes vías empleadas.

En los diversos órganos evaluados, tanto por microscopía con luz UV y en los cortes de parafina sometidos a inmunohistoquímica, cualitativamente se detectó presencia adenoviral diseminada en encéfalo (cerebro y cerebelo), pulmón, hígado, intestino delgado, páncreas, bazo, corazón, riñón y sistema reproductor. Las observaciones para la proteína GFP correlacionaron tanto por observación directa e inmunohistoquímica en encéfalo, pulmón, hígado y riñón. Las vías EV e IU resultaron ser las de mayor distribución hepática. En cuanto a la expresión o presencia de la proteína GFP, ésta fue mayor en hígado, corazón y riñón al examinarse por inmunohistoquímica.

En la evaluación de los valores de laboratorio clínico obtenidos de AST, ALT y bilirrubinas totales, se encontró que la transducción con  $3 \times 10^{10}$  pv en ratas gestantes no produjo hepatotoxicidad al día evaluado (5 d.p.t.). Se observó diferencia significativa en el valor promedio de ALT en las ratas transducidas con la mezcla adenoviral por la vía endovenosa, siendo éste menor al compararlo con el obtenido por el grupo control; sin embargo, dado que la hepatotoxicidad evaluada por este parámetro se da por el aumento

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -  
*L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez*

en estos valores, la disminución en el valor de las mismas no implicó efecto hepatotóxico alguno. En cuanto al valor de AST, se observó un aumento en este valor en el grupo de ratas no gestantes transducidas con la mezcla adenoviral, por lo que el aumento podría corresponder al estado gestacional *per se*.

Anatomopatológicamente, los órganos con mayor daño debido a la transducción adenoviral fueron riñón y bazo, observándose un mayor daño tisular en ratas no gestantes transducidas con la misma concentración del vector adenoviral en riñón e hígado.

**A N E X O S**

**ANEXO A**

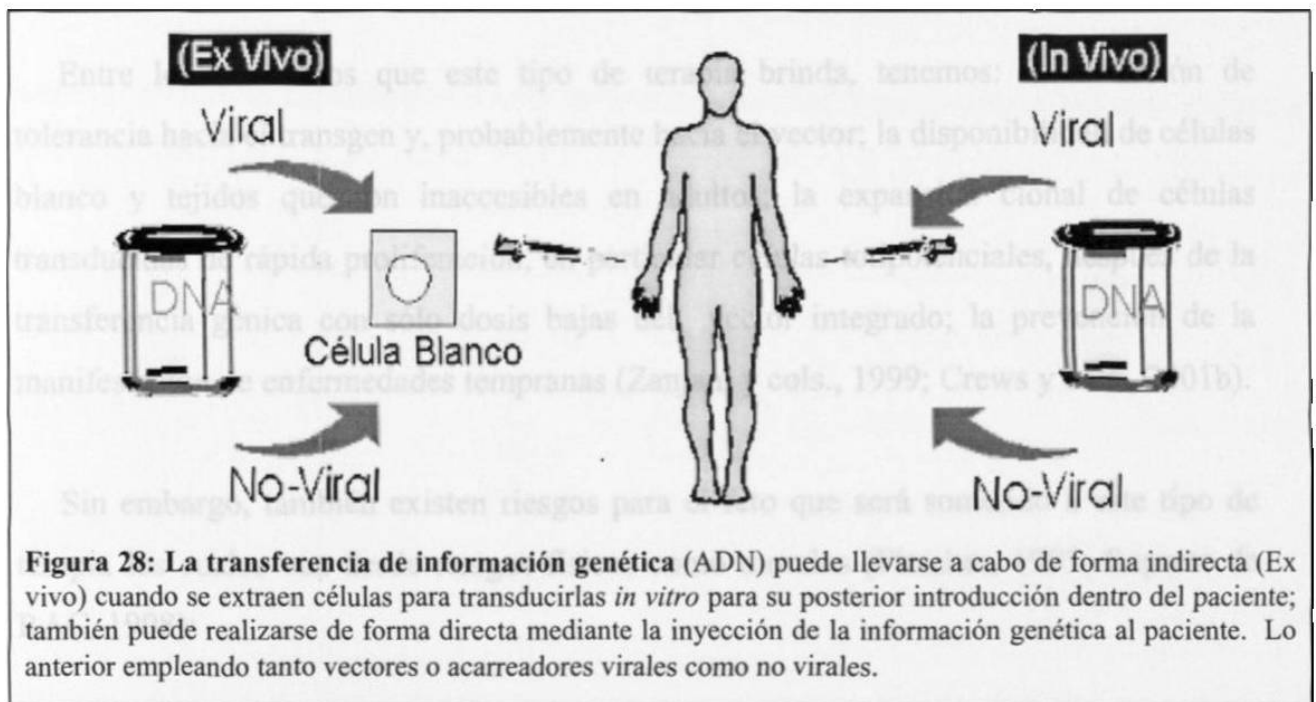
**METODOLOGÍA DE LA TERAPIA GÉNICA**

## ANEXO A

### METODOLOGÍA DE LA TERAPIA GÉNICA

La idea básica de la metodología en la terapia génica se tenía desde los años sesentas, cuando varios investigadores (E. Tatum, Lederberg, A. Kornberg y F. Anderson) lograron visualizar los conocimientos que se podrían ir adquiriendo y la forma en la cual podía llevarse a cabo la “manipulación y selección de genes para tratar enfermedades humanas mediante el empleo de virus benéficos” en lo que denominaban “terapia virogénica”. (Anderson y cols., 1984).

Actualmente, la terapia génica se puede describir como la transferencia de material genético a células aisladas (ex vivo) o directamente a tejidos (in vivo) para reemplazar una proteína defectuosa o para ejercer un efecto terapéutico (Mulligan y cols., 1993; Baumgartner y cols., 1999) (figura 28).



Recientemente, se ha desarrollado la terapia génica *in utero* o prenatal que propone la microinyección del ADN benéfico en el embrión (*i.e.* células somáticas tempranas) (Reporte 142, 2000). Ésta terapia pretende aliviar y o curar enfermedades antes de que los síntomas se presenten (Porada y cols., 1998; Lipshutz y cols., 1999). Las enfermedades candidatas a ser tratadas por medio de esta técnica, deben de cumplir con al menos uno de los siguientes requisitos:

- Deberán estar asociadas con altos riesgos de morbilidad y mortalidad para el feto, ya sea *in utero* o posnatalmente;
  - También se considerarán aquellas que no cuenten con una terapia post-natal efectiva;
  - Aquellas asociadas con anormalidades serias que sean corregidas o prevenidas por el gen, aquellas diagnosticables *in utero* y que tengan una relación bien definida entre el genotipo y fenotipo;
  - Aquellas que cuentan con un modelo animal que semeja estrechamente la condición humana.
- (Wang y cols., 1997; Stein y cols., 1999; Reporte de RAC, 1998; Crews y cols., 2001a).

Entre los beneficios que este tipo de terapia brinda, tenemos: la inducción de tolerancia hacia el transgen y, probablemente hacia el vector; la disponibilidad de células blanco y tejidos que son inaccesibles en adultos; la expansión clonal de células transducidas de rápida proliferación, en particular células totipotenciales, después de la transferencia génica con sólo dosis bajas del vector integrado; la prevención de la manifestación de enfermedades tempranas (Zanjani y cols., 1999; Crews y cols., 2001b).

Sin embargo, también existen riesgos para el feto que será sometido a este tipo de terapia los cuales van desde riesgos físicos como morales (Fletcher, 1995; Reporte de RAC, 1998):

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

*L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez*

- Los riesgos de larga duración provocados por el procedimiento, especialmente si hay una falla abarcan desde la inducción del parto prematuramente, que se ocasiona sepsis, reabsorción fetal, malformaciones, etc.
- Una posible mutación insercional puede provocar malformaciones severas a la activación de oncogenes u otras anormalidades.
- Los efectos del diagnóstico prenatal tanto en el sobreviviente como en otros hijos en la familia debe ser estudiado.
- Estos pacientes (fetos tratados) requieren un seguimiento de por vida para determinar las consecuencias a largo plazo.



**ANEXO B**

**VECTORES ADENOVIRALES**

## ANEXO B

### VECTORES ADENOVIRALES

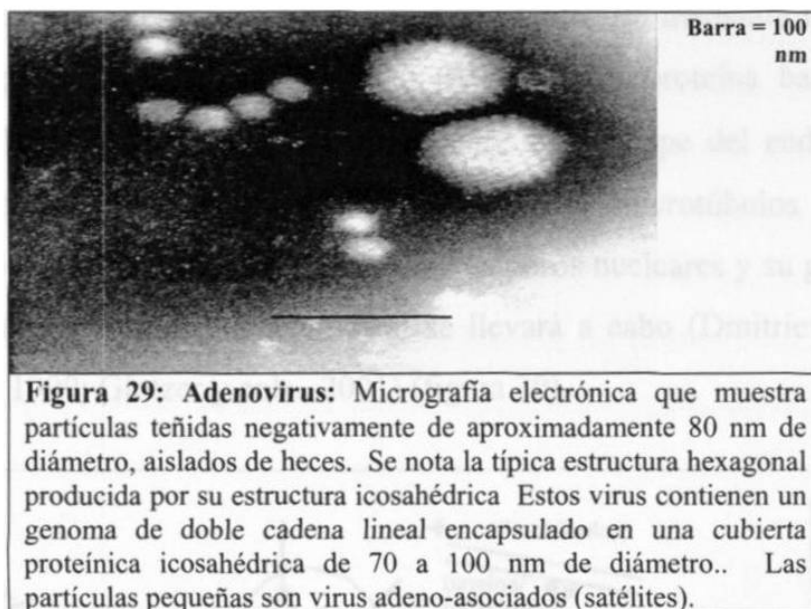
Los adenovirus (figura 29) fueron identificados en 1953 por Rowe y colaboradores en cultivos celulares primarios derivados de adenoides humanos como agentes causales de la degeneración de este tipo de células. Posteriormente, otros grupos de investigación los observaron relacionados con enfermedades respiratorias agudas (síndromes respiratorios febriles agudos). Son responsables de una pequeña porción de la morbilidad respiratoria aguda en la población general, y cerca del 5 al 10% de enfermedades respiratorias en niños. Los adenovirus también pueden causar conjuntivitis y gastroenteritis infantil (Shenk y cols., 1996). A partir de 1993 se empezaron a emplear para la transferencia de genes dentro de células de mamíferos por las siguientes ventajas:

- introducen eficientemente ADN dentro de células huéspedes tanto *ex vivo* como *in vivo*,
- son capaces de transducir células en división o quiescentes,
- no son inactivados por el sistema complemento *in vivo*,
- son redirigibles para transfectar diferentes células diana,
- raramente se integran al genoma de las células infectadas,
- pueden ser fácilmente producidos con altos títulos.

(Fields y cols., 1996; Massie y cols., 1998; Mountain, 2000; Havenga y cols., 2002).

A la fecha, se han identificado 51 serotipos adenovirales humanos agrupados en 6 subgéneros (subespecies A, B, C, D, E, y F) de acuerdo a sus propiedades de hemoaglutinación y criterios biofísicos y bioquímicos (De Jong y cols., 1999). Los serotipos Ad2 y Ad5 (subgrupo C) han sido asociados con infecciones de vías aéreas

superiores, al igual que el serotipo Ad3 (subgrupo B), aunque este último parece infectar una región anatómica de las vías aéreas distinta. Los serotipos Ad8 y Ad9 (subgrupo D) están asociados con queratoconjuntivitis, Ad4 (subgrupo E) esta asociado con neumonía, Ad12 (subgrupo A) es asociado con infecciones entéricas crípticas, y los Ad40 y Ad41 (subgrupo F) son asociados con gastroenteritis (Roelvink y cols., 1998). La mayoría de las infecciones adenovirales en general, involucran al tracto respiratorio, gastrointestinal o el ojo (AJC 1997).

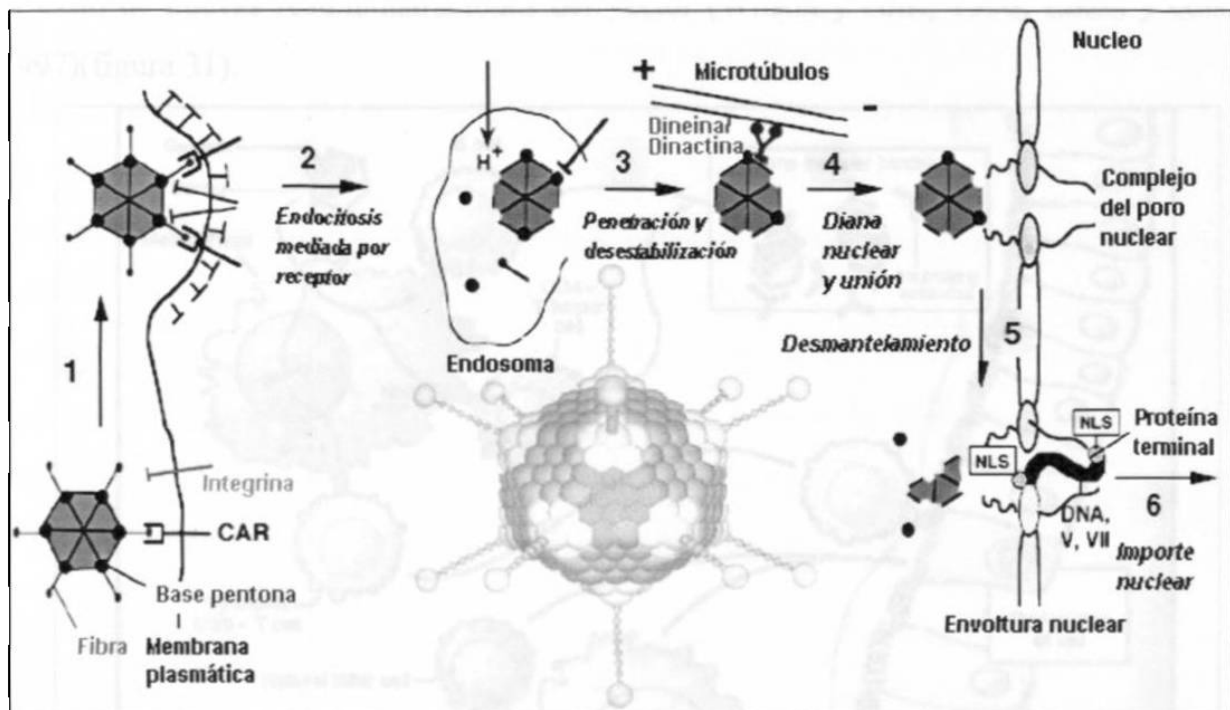


Numerosos estudios han demostrado que el tropismo adenoviral esta determinado por el tipo de interacción existente entre la fibra de cada uno de los serotipos con receptores celulares, principalmente el receptor CAR e integrinas (Bergelson y cols., 1997; Dmitriev y cols., 1998).

La especificidad del receptor y la cinética de unión y afinidad de las fibras adenovirales con sus receptores celulares correspondientes contribuyen en el tropismo adenoviral. Adicionalmente, la existencia de distintos receptores de internalización sugiere interacciones proteína – proteína dependiente del serotipo adenoviral (Kirby y cols., 2001).

Mecanismo para la infección celular por adenovirus.

Los pasos iniciales para la infección celular por el adenovirus involucran al menos dos interacciones secuenciales entre el virus y la célula, cada una siendo regulada por un componente proteínico específico de la cápside adenoviral. La primera unión entre el adenovirus y los receptores de la superficie celular (CAR y dominio  $\alpha 2$  de MHC-I) se da mediante el dominio knob de la proteína de la fibra. Esta es seguida por la internalización del virus con un endosoma recubierto con la proteína clatrina. Posteriormente, el virus escapa del endosoma al acidificarlo mediante la interacción de un motivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) de la proteína base pentona con integrinas celulares  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ . Posteriormente a su escape del endosoma, el virus parcialmente desmantelado es transportado mediante microtúbulos y/o filamentos intermedios tipo vimentina a los complejos de los poros nucleares y su genoma liberado al nucleoplasma donde la replicación viral se llevará a cabo (Dmitriev y cols., 1998; Walters y cols. 1999; Glotzer y cols., 2001) (figura 30).



**Figura 30: Infección adenoviral.** Mediante la interacción entre proteínas en la superficie de la cápside adenoviral y proteínas transmembranales celulares, se realiza la unión del adenovirus a la membrana plasmática para su posterior endocitosis y desmantelamiento necesarios para la liberación del genoma adenoviral al núcleo celular para que se lleve a cabo su replicación.  
Modificado de: <http://www.unizh.ch/%7Ecellbio/pages/galleryPages/img06.html>

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -  
L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez

Sólo 80-85% de los adenovirus que se unen en el son internalizados. De estos, el 50% pasa a endosomas en los siguientes 10 minutos. El 90% de estos últimos, en un tiempo medio de 5 minutos es liberado al citoplasma antes de la formación del lisosoma. Se pueden observar partículas virales en los complejos de poro nuclear 40 minutos después de la penetración mediante microscopía electrónica. Después de 120 minutos, cerca del 40% de las partículas internalizadas han liberado su ADN libre de proteínas hexónicas (Shenk y cols., 1996).

Respuesta inmune al adenovirus

El vector es fagocitado por los macrófagos siendo su genoma lineal de doble cadena alojado en el núcleo del macrófago en donde expresará las proteínas virales que serán presentadas por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I a las células T CD8. Las células T CD4, activadas por los antígenos de la cápside viral, estimulan a los linfocitos T citotóxicos que destruirán a las células que hayan sido infectadas y provocarán inflamación. Adicionalmente, las células B son activadas para secretar anticuerpos que neutralicen al vector. Estos anticuerpos neutralizantes impiden el éxito de nuevas readministraciones del vector (Wilson y cols., 1996; Elkon y cols., 1997)(figura 31).

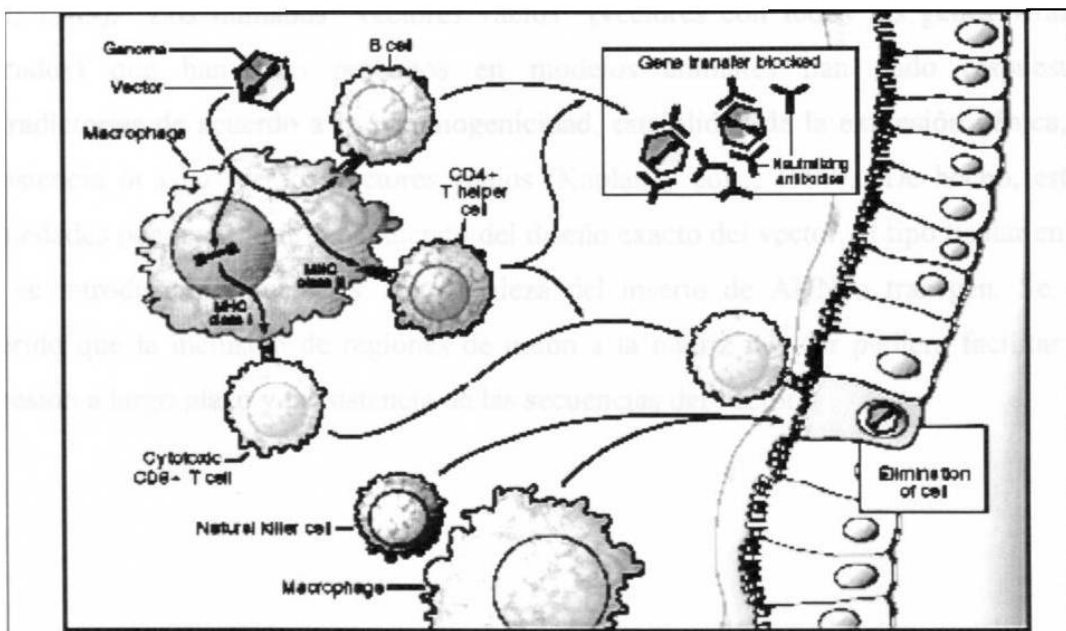


Figura 31: Respuesta inmune al adenovirus. En el esquema se muestra el papel de la respuesta celular y humoral despertada por las proteínas adenovirales.

### Vectores adenovirales por generación

Los primeros genes adenovirales o tempranos regulan la expresión de los llamados genes tardíos y están involucrados con el control del ciclo celular de la célula infectada. En la ausencia o delección de los genes tempranos, el virus no se replica *in vivo*, mientras que los genes tardíos pueden permanecer inactivos o dormidos; la anterior constitución genómica la tenían los llamados adenovirus de la primera generación, su desventaja es la corta duración dentro de la célula (Yang y cols., 1994; Wilson y cols., 1996). También se caracterizan por un tropismo característico de acuerdo a la vía de administración empleada *in vivo* (Kajon y cols., 1998).

Los vectores de la segunda generación tienen delecciones adicionales en la región E3 para crear espacios para la inserción de transgenes. La región E3 suprime las respuestas del sistema inmune del huésped durante la infección del virus, pero no se requiere para la replicación o empaquetamiento *in vitro*. Estos vectores desarrollan respuestas inmunitarias e inflamatorias fuertes (Ali y cols., 1994). También se han construido vectores con delección de otros genes tempranos adicionales, E2 y o E4 (Ginsberg y cols., 1989). Los llamados “vectores vacíos” (vectores con todos los genes virales deletados) que han sido probados en modelos animales han dado respuestas contradictorias de acuerdo a la inmunogenicidad, estabilidad de la expresión génica, y persistencia *in vivo* de los vectores vacíos (Kaplan y cols., 1997). De hecho, estas propiedades pueden diferir dependiendo del diseño exacto del vector, el tipo tisular en el que se introduzca el vector, y la naturaleza del inserto de ADN o transgen. Se ha sugerido que la inclusión de regiones de unión a la matriz nuclear pudiera facilitar la expresión a largo plazo y persistencia de las secuencias del vector.

**ANEXO C**

**EMPLEO DE GENES REPORTEROS**

## ANEXO C

### EMPLEO DE GENES REPORTEROS

Los genes reporteros se emplean para evaluar la eficiencia de una transferencia de genes de un vector particular a células procariotas o eucariotas (transformación y transducción, respectivamente), así como para identificar localización celular o subcelular de una actividad metabólica en células eucariotas, identificar posibles dominios activadores y represores, realizar análisis mutacionales en promotores, evaluar la expresión de secuencias promotoras, etc.

El producto del gen reportero debe ser fácilmente detectable. Algunos de los genes más ampliamente usados como reporteros son el gen *lacZ*, *gfp* y *gus* (Holzinger y cols., 1995; Brejc y cols., 1997; Casal y cols., 2001).

La proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés), tiene un peso molecular de 27 kDa constituidos por 238 aa. Esta compuesta por una sola cadena polipeptídica y fluoresce a una longitud de onda máxima de 508 nm cuando es irradiada con UV. Esta proteína puede observarse *in vivo* y no requiere de ensayos preparativos. (Niwa y cols., 1996; Bonner y cols., 1995; Guex y cols., 1999).

El gen *lacZ* codifica para la enzima beta galactosidasa; esta proteína es tetramérica, pesa 464 kDa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del sustrato X-gal, siendo los cristales resultantes de color azul fácilmente visualizable.



**ANEXO D**

**EL CICLO ESTRAL EN LA RATA**

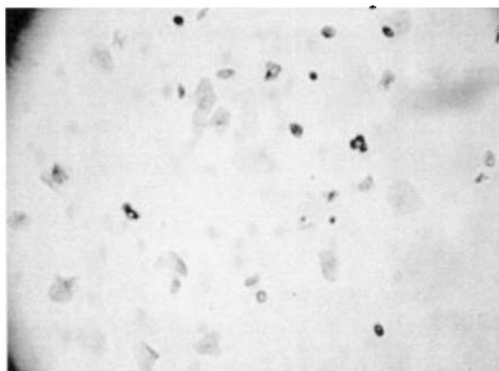
## ANEXO D

### EL CICLO ESTRAL EN LA RATA

En los primates existe lo que se conoce como ciclo menstrual y en la mayoría de especies de mamíferos el llamado ciclo estral, siendo ambos relativamente iguales (se diferencian principalmente en su duración). Se divide en 4 fases: Estro, Metaestro, Diestro y Proestro.

**PROESTRO.** La hembra empieza a aceptar al macho. Es la fase antecesora a la ovulación. Dura 12 hrs.

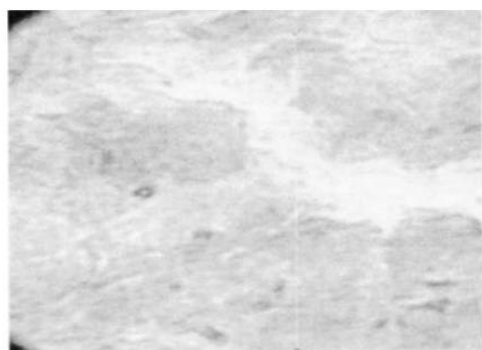
Ovario: Maduración de los folículos.



Endometrio: Proliferación glandular, disminución en los niveles de progesterona, liberación de la hormona folículo estimulante (HFE), crecimiento del folículo y aumentan los niveles de estrógenos.

Citología vaginal: Células epiteliales redondeadas con grandes núcleos. El aspecto del frotis es muy limpio.

**ESTRO.** Fase de receptividad sexual y en la que ocurre la ovulación. Dura 12 hrs.



Ovario: Folículos maduros, endometrio con proliferación glandular, inicia la formación del cuerpo amarillo. Al final de esta fase disminuye la hormona luteinizante (HL) y disminuyen los estrógenos circulantes.

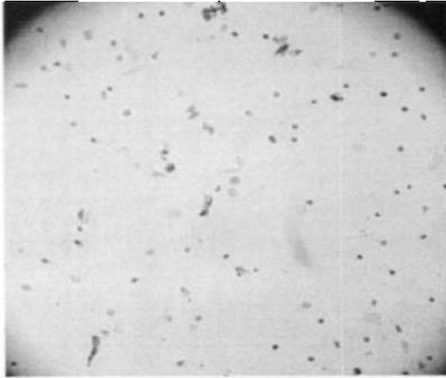
Citología vaginal: Células epiteliales vaginales

-Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

*L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez*

escamosas poligonales empaquetadas, no hay presencia de leucocitos y el aspecto general del frotis es muy limpio, es decir, no hay presencia de mucina.

**METAESTRO.** La hembra rechaza al macho (No receptividad al macho). En fase postovulatoria. Desarrollo del cuerpo lúteo e inicia secreción de progesterona. (Escaso material celular, incluyendo leucocitos [cóctel celular]). Dura 21 hrs.



Citología vaginal: Pueden observarse células escamosas, células epiteliales redondas con grandes núcleos y leucocitos. En algunas ocasiones, el aspecto del frotis puede ser turbio debido a la presencia de

mucina.

**DIESTRO.** También se rechaza al macho. Fase del cuerpo amarillo. Existe influencia de la progesterona luteínica sobre las estructuras sexuales accesorias. Dura 57 hrs.



Ovario: Con uno, dos o más cuerpos amarillos.

Citología vaginal: Abundancia de leucocitos y la escasez de cualquier otro tipo de células. Se observa, en general, un porcentaje mayor al 50% de leucocitos..

NOTA: El mecanismo de los ciclos estrales se basa en los cambios de la citología vaginal, que están regulados por las hormonas esteroides que actúan sobre los órganos sexuales accesorios.

## **REFERENCIAS**

## REFERENCIAS

Ali M, Lernoine R, Ring JA (1994). "The use of DNA viruses as vectors for gene therapy". *Gene Therapy* 1:367-384.

AJC (1997). "Adenoviruses". Actualizado: *September 5, 192002*.  
<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Reading.html>

Anderson WF (1984). "Prospects for human gene therapy". *Science* 226:401-409.

Baumgartner TL, Baumgartner BJ, Hudon L, Moise KJ (1999). "Ultrasonographically guided direct gene transfer in utero: Successful induction of [beta]-galactosidase in a rabbit model". *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 181(4):848-852.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5". *Science*. 275:1320-1323.

Bivin WS, Crawford MP, Brewer NR, Baker HJ (1979) "The laboratory rat". Ch 4 *Morphophysiology*". Academic Press. p 79 – 103.

Bonner JT, Compton KB, Cox EC, Fey P, Gregg KY (1995). "Development in One Dimension: The Rapid Differentiation of Dictyostelium discoideum in Glass Capillaries" *PNAS* 92:8249-8253.

Boyle MP, Enke RA, Adams RJ, Guggino WB, Zeitlin PL (2001). "In Utero AAV-Mediated Gene Transfer to Rabbit Pulmonary Epithelium". *Molecular Therapy* 4:115-121.

Brejc K, Sixma TK, Kitts PA, Kain SR, Tsien RY, Ormö M, Remington SJ (1997). "Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea Victoria* green fluorescent protein". *PNAS* 94:2306-2311.

Casal ML, Wolfe JH (2000). "Mucopolysaccharidosis Type VII in the Developing Mouse Fetus". *Pediatric Research* 47:750-756.

Casal ML, Wolfe JH (2001). "In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of  $\beta$ -glucuronidase can delay onset of clinical signs". *Blood* 97: 1625-1634.

Chan SY, Li K, Piccotti JR, Louie MC, Judge TA, Turka LA, Eichwald EJ, Bishop DK (1999). "Tissue-specific consequences of the anti-adenoviral immune response: implications for cardiac transplants". *Nature medicine* 5:1143-1149.

Crews FT (2001)a. "Summary Report of a Symposium: Genes and Gene Delivery for Diseases of Alcoholism". *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25:1792.

Crews FT (2001)b. "Summary Report of a Symposium: Genes and Gene Delivery for Diseases of Alcoholism". *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25:1799.

David A, Cook T, Waddington S, Peebles D, Nivsarkar M, Knapton H, Miah M, Dahse T, Noakes D, Schneider H, Rodeck C, Coutelle C, Themis M (2003). "Ultrasound-Guided Percutaneous Delivery of Adenoviral Vectors Encoding the  $\beta$ -Galactosidase and Human Factor IX Genes to Early Gestation Fetal Sheep *In Utero*". *Human Gene Therapy* 14:353-364.

De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJJ, Khoo SH, Hierholzer JC (1999). "Adenoviruses from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals, Including Two Strains That Represent New Candidate Serotypes Ad50 and Ad51 of Species B1 and D, Respectively". *Journal of Clinical Microbiology* 37:3940-3945.

Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT (1998). "An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism". *Journal of Virology* 72:9706-9713.

Elkon KB y cols. (1997). "Tumor necrosis factor  $\alpha$  plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors". *PNAS USA* 94:9814-9819.

Fields B, Knipe DM, Howley PM (1996). "Fields virology" (3<sup>rd</sup> Edition) Lippincott-Raven.

Fletcher (1995). "Presentation on Ethical Issues Associated with *In Utero* Gene Therapy". <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/minutes/124-5-95.htm#XI>

Frederickson RM, Carter BJ, Pilaro AM (2003). "Nonclinical Toxicology in Support of Licensure of Gene Therapies". *Molecular Therapy* 8:8-10.

Friedmann T (2003). "Gene Therapy's New Era: A Balance of Unequivocal Benefit and Unequivocal Harm". *Molecular Therapy* 5:5-7.

Ginsberg H y cols. (1989). "Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease". *PNAS USA* 86:3823-3827.

Glotzer JB, Michou AI, Baker A, Saltik M, Cotten M (2001). "Microtubule-Independent Motility and Nuclear Targeting of Adenoviruses with Fluorescently Labeled Genomes". *Journal of Virology* 75:2421-2434.

Guex N, Diemand A, Peitsch MC (1999). "Protein modelling for all". *TIBS* 24:364-367.

Hartig PC, Hunter III ES (1998). "Gene Delivery to the Neurulating Embryo During Culture". *Teratology* 58:103-112.

Havenga MJE, Lemckert AAC, Ophorst OJAE, Meijer M, Germeraad WTV, Grimbergen J, Doel MA, Vogels R, Deutekom J, Janson AAM, Bruijin JD, Uytdehaag F, Quax PHA, Logtenberg T, Mehtali M and Bout A (2002). "Exploiting the Natural Diversity in Adenovirus Tropism for Therapy and Prevention of Disease". *Journal of Virology* 76:4612-4620.

Hennig AK (2001). "In Utero Gene Therapy for Mucopolysaccharidoses". Vínculo en internet: <http://www.mpssociety.org/grants.html> [Transactions Of The Nineteenth Annual Meeting Of The Society For Maternal-Fetal Medicine].

Holzinger A, Trapnell BC, Weaver TE, Whitsett JA, Iwamoto HS (1995). "Intraamniotic administration of an adenoviral vector for gene transfer to fetal sheep and mouse tissues". *Pediatric Research* 38:844-850.

Kajon AE, Brown CC, Spindler KR (1998). "Distribution of Mouse Adenovirus Type I in Intraperitoneally and Intranasally Infected Adult Outbred Mice". *Journal of Virology* 72:1219-1223.

Kaplan M y cols. (1997). "Characterization of factors involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung". *Human Gene Therapy* 8:45-56



Kim JS, Han HS, Parl SH, Chun YK, Lee HJ, Chi JG (1997). "Neonatal adenoviral pneumonia-report of three autopsy cases". *Journal of Korean Medical Sciences* 12:146-150.

Kirby I, Lord R, Davison E, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santisi G (2001). "Adenovirus Type 9 Fiber Knob Binds to the Coxsackie B Virus-Adenovirus Receptor (CAR) with Lower Affinity than Fiber Knobs of Other CAR-Binding Adenovirus Serotypes". *Journal of Virology* 75:7210-7214.

Lai L, Davidson BB, Veazey RS, Fisher KJ, Baskin GB (2002). "A preliminary Evaluation of Recombinant Adeno-Associated Virus Biodistribution in Rhesus Monkeys After Intrahepatic Inoculation *In Utero*". *Human Gene Therapy* 13:2027-2039.

Larson JE, Morrow SL, Delcarpio JB, Bohm RP, Ratterree MS, Blanchard JL, Cohen JC (2000). "Gene Transfer into the Fetal Primate: Evidence for the Secretion of Transgene Product". *Molecular Therapy* 2:631-640.

Lefesvre P, Attema J, Lemckert A, Havenga M, Bekkum DV (2003). "Genetic heterogeneity in response to adenovirus gene therapy". *BMC Molecular Biology* 4:1-14.

Lipshutz GS, Flebbe-Rehwaldt L, Gaensler KML (1999). "Adenovirus-Mediated Gene Transfer in the Midgestation Fetal Mouse". *Journal of Surgical Research* 84:150-156.

Lipshutz GS, Sarkar R, Flebbe-Rehwaldt L, Kazazian H, Gaensler KML (1999). "Short-term correction of factor VIII deficiency in a murine model of hemophilia A after delivery of adenovirus murine factor VIII *in utero*". *Proceeding National Academy of Science* 96:13324-13329.

Lipshutz GS, Gruber CA, Cao Y, Hardy J, Contag CH, Gaensler ML (2001). "In Utero Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors: Intraperitoneal Gene Transfer Produces Long-Term Expression". *Molecular Therapy* 3:284-292.

MacIntyre DJ, Chang HH, Kaufman MH (1995). "Teratogenic effects of amniotic sac puncture: a mouse model". *Journal of Anatomy* 186:527-539.

Márquez Lona EM (2003). "Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en fetos de rata". Tesis de maestría en ciencias con especialidad en biología molecular e ingeniería genética, FM-UANL.

Martínez CMA (1984). "Manual para el cuidado y utilización de los animales de laboratorio: ratas, ratones y conejos". Tesis Profesional de MVZ-UNAM. México DF.

Massie B, Kamen A, Cote J (1998). "Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells". *Biotechnological Bioengineering* 59:567-575.

Mountain A (2000). "Gene therapy: the first decade". *Trends in BioTechniques* 18:119-128.

Mulligan RC (1993). "The Basic Science of Gene Therapy". *Science* 260:926-931.

NIH Report (2002). "Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee". *Human Gene Therapy* 13:3-13.

Niwa H, Intuye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima S, Kubota M, Ohashi M, Tsuji F (1996). "Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein". *PNAS* 93:13617-13622;

Porada CD, Tran N, Eglitis M, Moen RC, Troutman L, Flake AW, Zhao Y, Anderson WF, Zanjani ED (1998). "In Utero Gene Therapy: Transfer and Long-Term Expression of the Bacterial *neo<sup>r</sup>* Gene in Sheep after Direct Injection of Retroviral Vectors into Preimmune Fetuses". Human Gene Therapy 9:1571-1585.

Reporte 142 de la Oficina Parlamentaria de Ciencia y Tecnología (2000). "Human Genome Research". Vínculo en internet: [www.parliament.uk/post/home.htm](http://www.parliament.uk/post/home.htm)

Reporte del RAC (por sus siglas en inglés: Recombinant DNA Advisory Committee) (1998). "Prenatal Gene Transfer: Scientific, Medical, and Ethical Issues". Número de publicación del NIH: 00-4720.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ (1998). "The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F". Journal of Virology 72:7909-7915.

Roitt I (1994). "Essential Immunology". 8<sup>th</sup> Edition. Editorial Blackwell Science. p 175.

Rojas-Martínez A, Wyde PR, Montgomery CA, Chen SH, Woo SLC, Aguilar-Cordova E (1998). "Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1A-deficient adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat". Cancer Gene Therapy 5:365-370.

Rossi RJ (2001). "Primate *in Utero* Gene Transfer Comes of Age". Molecular Therapy 3:274-275

Shenk T (1996). "Adenoviridae: The viruses and their replication". Capítulo 67 Fields Virology 3a Edición. Ed. Por B.N. Fields. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.

Snyder SK, Wessner DH, Wessells JL, Waterhouse RM, Wahl LM, Zimmermann W, Dveksler GS (2001). "Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes". *American Journal of Reproductive Immunology* 45:205-216.

Stein CS, Ghodsi A, Derksen T, Davidson BL(1999). "Systemic and Central Nervous system Correction of Lysosomal Storage in Mucopolysaccharidosis Type VII Mice". *Journal of Virology* 73:3424-3429.

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy". *Nature Reviews Genetics* 4:346-358.

Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, Zabner J (1999). "Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia". *Journal of Biological Chemistry* 274:10219-226.

Wang L, Zoppè M, Hackeng TM, Griffin JH, Lee KF (1997). "A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy". *PNAS* 94:11563-11566.

Wells DJ, Wells KE (2002). "Gene transfer studies in animals: what do they really tell us about the prospects for gene therapy in DMD?". *Neuromuscular Disorders* 12 Suppl 1:S11-S22.

Wilson JM (1996). "Adenoviruses as gene delivery vehicles". *The New England Journal of Medicine* 334:1185-1187.

Woo YJ, Raju GP, Swain JL, Richmond ME, Gardner TJ, Balice-Gordon RJ (1997). "In utero cardiac gene transfer via intraplacental delivery of recombinant adenovirus". *Circulation* 96:3561-3569.

Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR (1999). "Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse". *Cancer Gene Therapy* 6:367-372.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy". *PNAS* 91:4407-4411.

Zanjani ED, Anderson WF (1999). "Prospects for in Utero Human Gene Therapy": *Science* 285:2084-2088.

Zinn KR, Douglas JT, Smyth CA, Liu HG, Wu Q, Krasnykh VN, Mountz JD, Curiel DT, Mountz JM (1998). "Imaging and tissue biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-labeled adenovirus knob (serotype 5)". *Gene Therapy* 5:798-808.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez**

Candidata para el Grado de Maestra en Ciencias

con Especialidad en Biología Molecular

e Ingeniería Genética

**Tesis:** Efectos tóxicos debidos a la transducción adenoviral durante la gestación.

**Campo de Estudio:** Terapia Génica

**Biografía:**

Lugar de Nacimiento: México, D.F.

Fecha: 31 de Marzo de 1979.

Padres: Dra. Bernarda Sánchez Flores y Dr. Aurelio Rueda Pimentel.

**Educación:**

Licenciatura: Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Grado Obtenido: Licenciada en Investigación Biomédica Básica.

Fecha: 17 de Septiembre del 2001.



