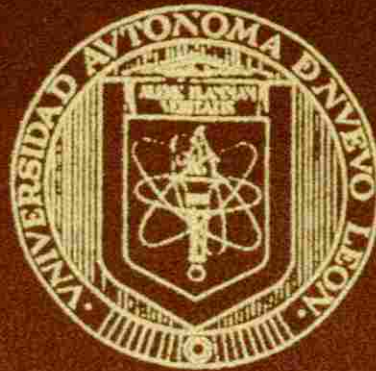


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



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

Por

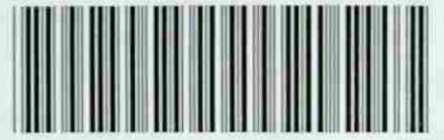
L.I.B.B. NAIKA GEORGINA RUEDA SÁNCHEZ

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

Diciembre, 2003

IN  
OR  
R8  
2003  
L1

LIB. B. B. NAIKA GEORGINA RUBEN DA SÁNCHEZ



1080122760



# QUANTIL

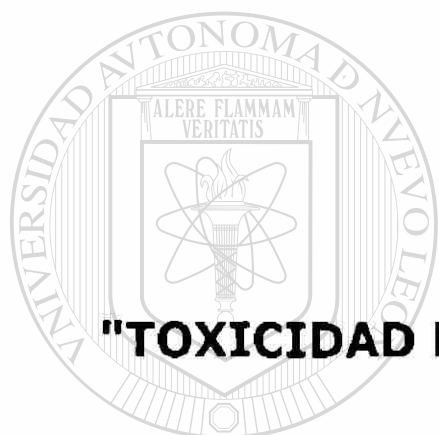
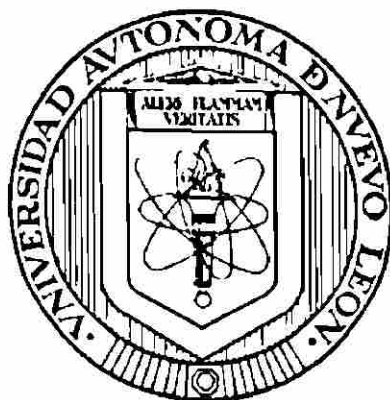
PER LA BIBLIOTECA DEL FONDAZIONE NUOVO UFFICIO

DELLA UNIVERSITA' DI TORINO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

®

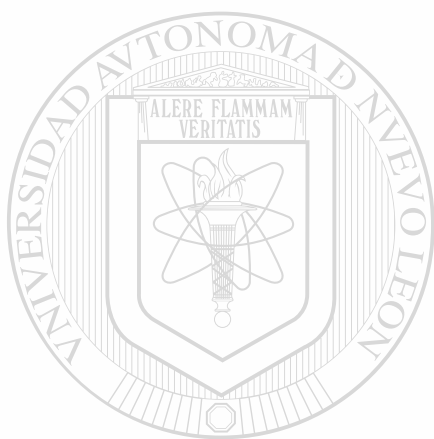
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

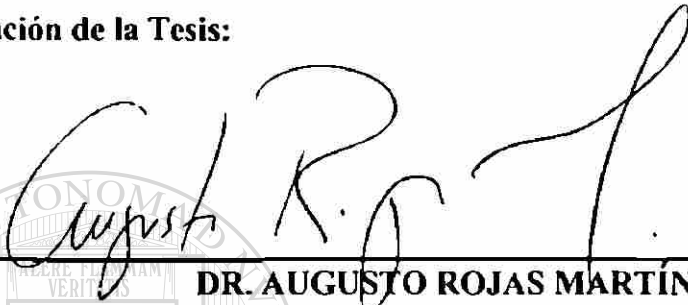
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

**Aprobación de la Tesis:**



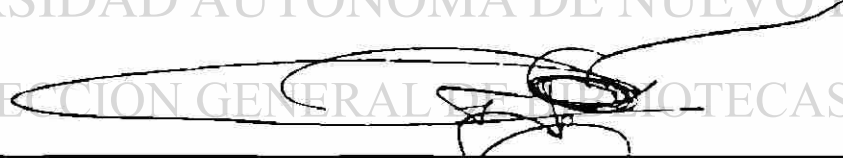
---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Director de Tesis



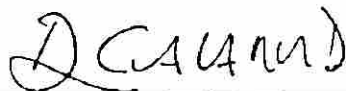
---

**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.

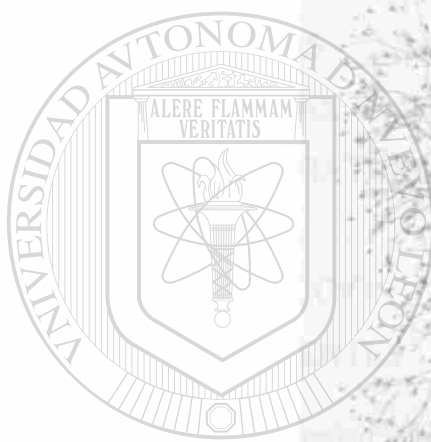
*A Montserrat:*

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 ti.

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*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 Especificos .....	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
<hr/>		
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 Reproductor 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 <sup>-</sup>	Adenovirus carentes de la secuencia E1
AdE3 <sup>-</sup>	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 <sup>®</sup> 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
$K_3Fe(CN)_6$	Cianuro de hierro y potasio II
$K_4Fe(CN)_6$	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 <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mm	Milímetro
n	Número
ngest	No gestante
NaCl	Cloruro de sodio



Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fósforo ácido de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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  $3 \times 10^{10}$  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 Gayza

## 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*

## -Toxicidad debida a la transducción adenoviral en ratas gestantes -

L.I.B.B. Naika G. Rueda Sánchez

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  $1 \times 10^{11}$  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  $\mu$ l como volumen máximo a emplear, dependiendo éste del d.p.c en el que se realice la transducción (p. ejem. 10  $\mu$ 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.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **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.

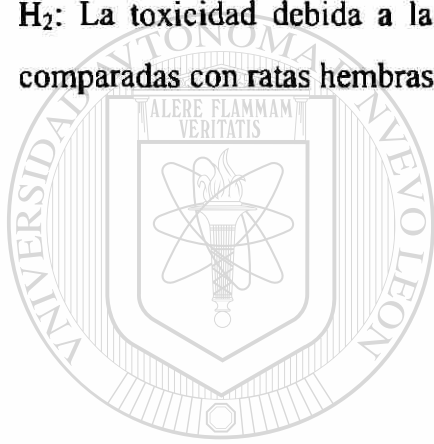


## **CAPÍTULO 5**

### **HIPÓTESIS**

H<sub>1</sub>: La toxicidad debida a la transducción del vector adenoviral en ratas gestantes es mayor en comparación con ratas gestantes inyectadas con el excipiente (PBS).

H<sub>2</sub>: La toxicidad debida a la transducción adenoviral es diferente en ratas gestantes comparadas con ratas hembras no gestantes.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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 delección 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  $\beta$ -galactosidasa).

---

#### Anestésico.

Se empleó una combinación volumen- volumen 2:1 de ketamina:xilacina administrada por vía IM siendo la dosis administrada igual a 1  $\mu$ 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.

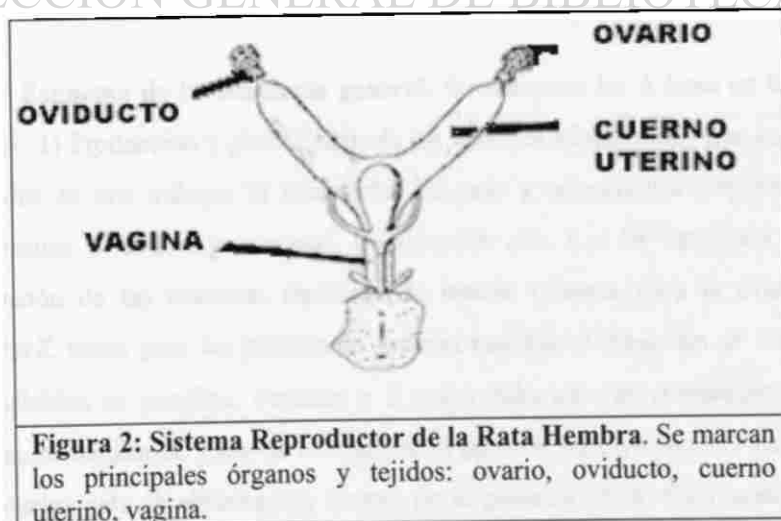
**Ratas.**



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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

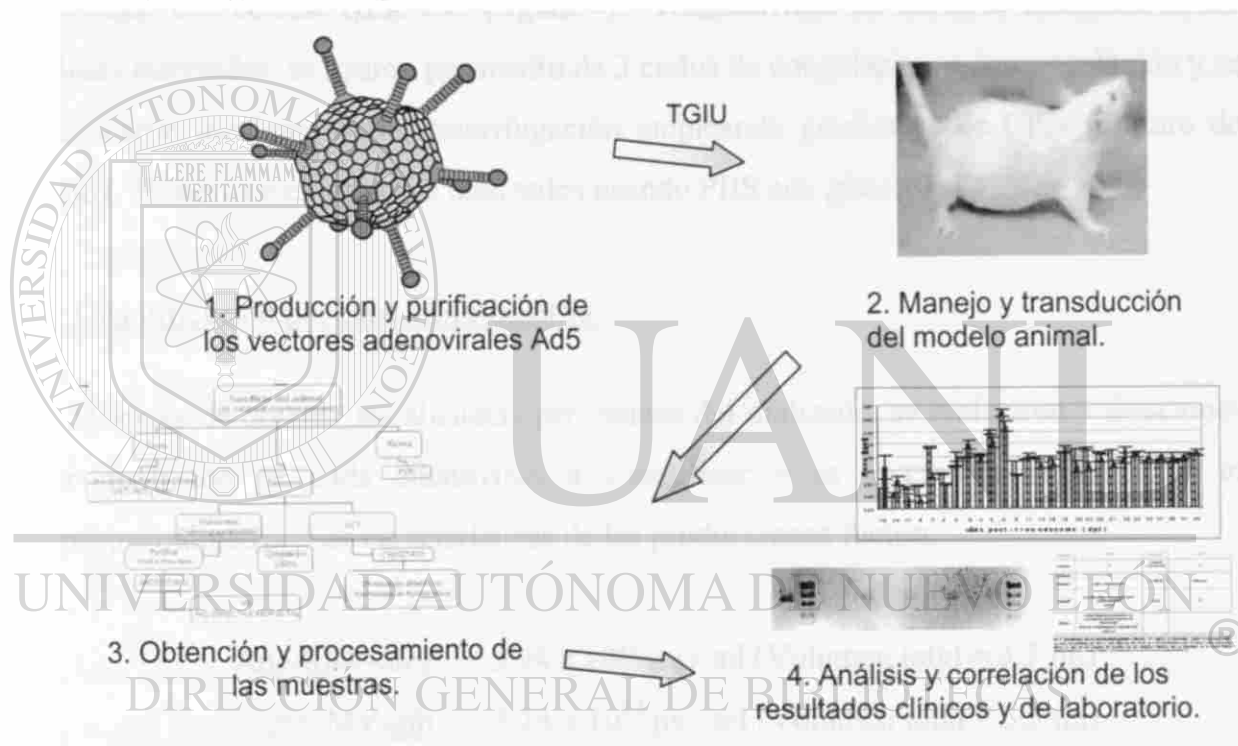


## CAPÍTULO 7

### 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  $3 \times 10^{10}$  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

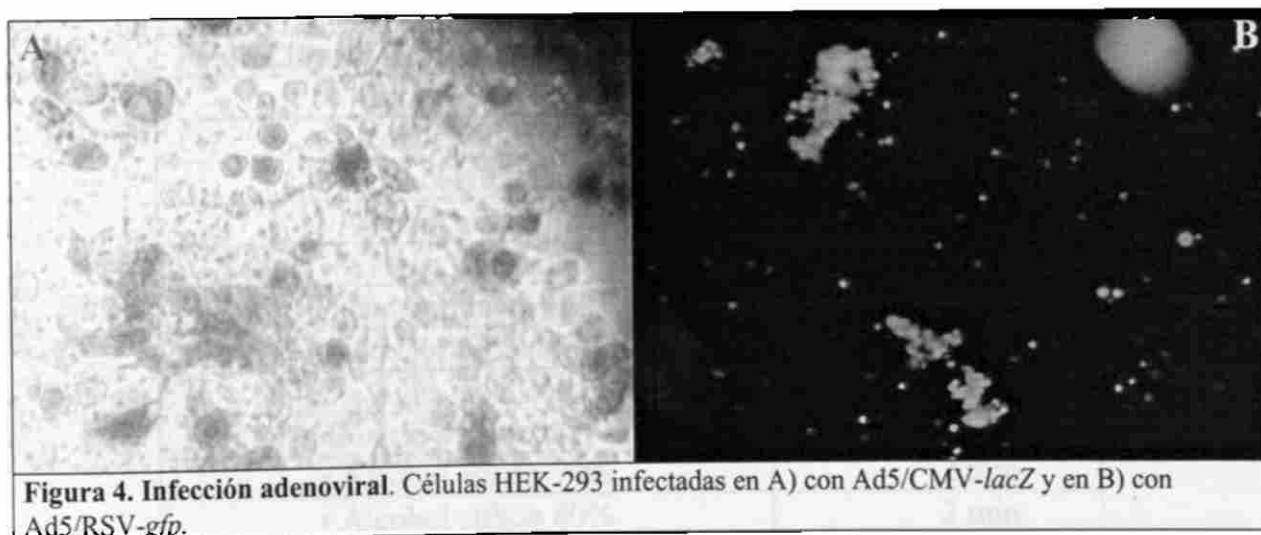
Los vectores adenovirales fueron transfectados en las células HEK-293 que complementan en *trans* los reguladores virales tempranos El para permitir su replicación y por ende la producción de partículas adenovirales. Su amplificación se realizó en 35 platos de 150 mm de diámetro con medio DMEM (Medio 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*  $5.94 \times 10^{12}$  pv / ml (Volumen total = 3.7 ml)

Ad5 CMV-*gfp*  $3.14 \times 10^{12}$  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

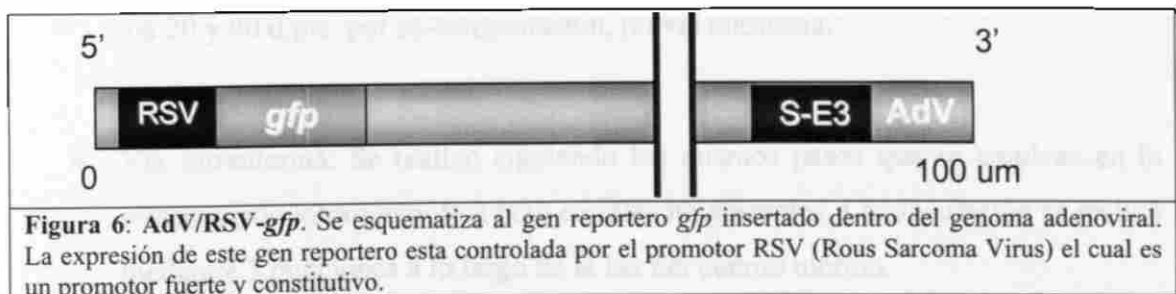
• Alcohol etílico 96%	2 min
• OG 6	4 min
• Alcohol etílico 96%	2 min
• EA 50	3 min
• Alcohol etílico 96%	2 min
• Etanol Absoluto	5 min
• Xileno	5 min.
Montados en resina de bálsamo de Canadá	

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].



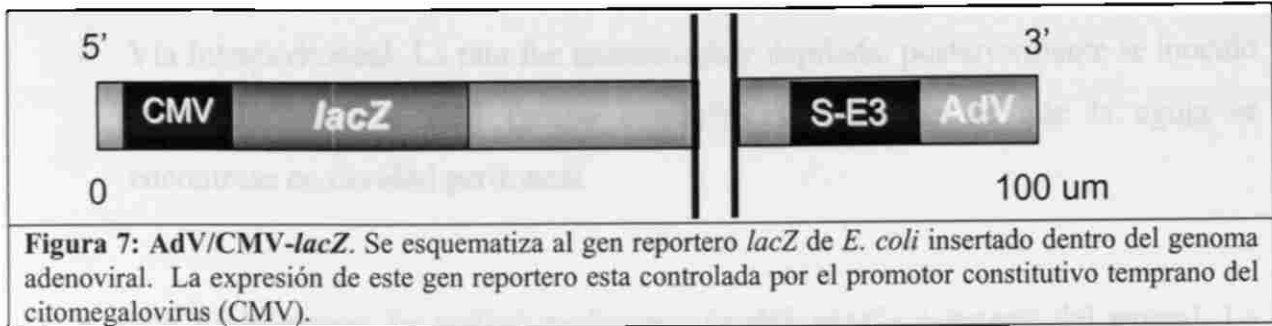


Figura 7: AdV/CMV-*lacZ*. Se esquematiza al gen reportero *lacZ* de *E. coli* insertado dentro del genoma adenoviral. La expresión de este gen reportero esta controlada por el promotor constitutivo temprano del citomegalovirus (CMV).

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<sub>xA</sub> 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  $3 \times 10^{10}$  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  $3 \times 10^{10}$  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  $3 \times 10^{10}$  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 $\mu$ l	Paso	Temperatura
Buffer 10X	2.5 $\mu$ 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 <sub>2</sub>	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.

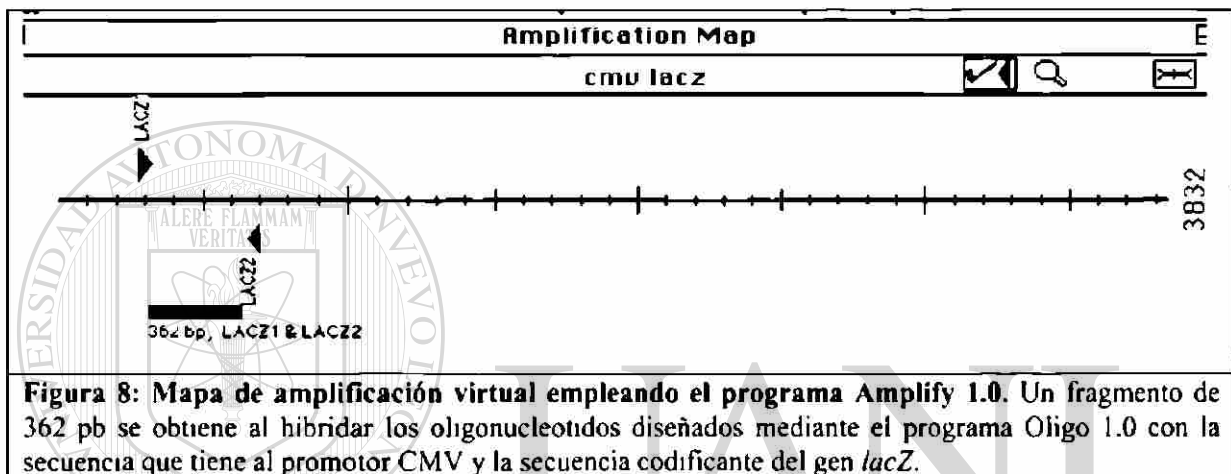


Figura 8: Mapa de amplificación virtual empleando el programa Amplify 1.0. Un fragmento de 362 pb se obtiene al hibridar los oligonucleotidos diseñados mediante el programa Oligo 1.0 con la secuencia que tiene al promotor CMV y la secuencia codificante del gen lacZ.

## 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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

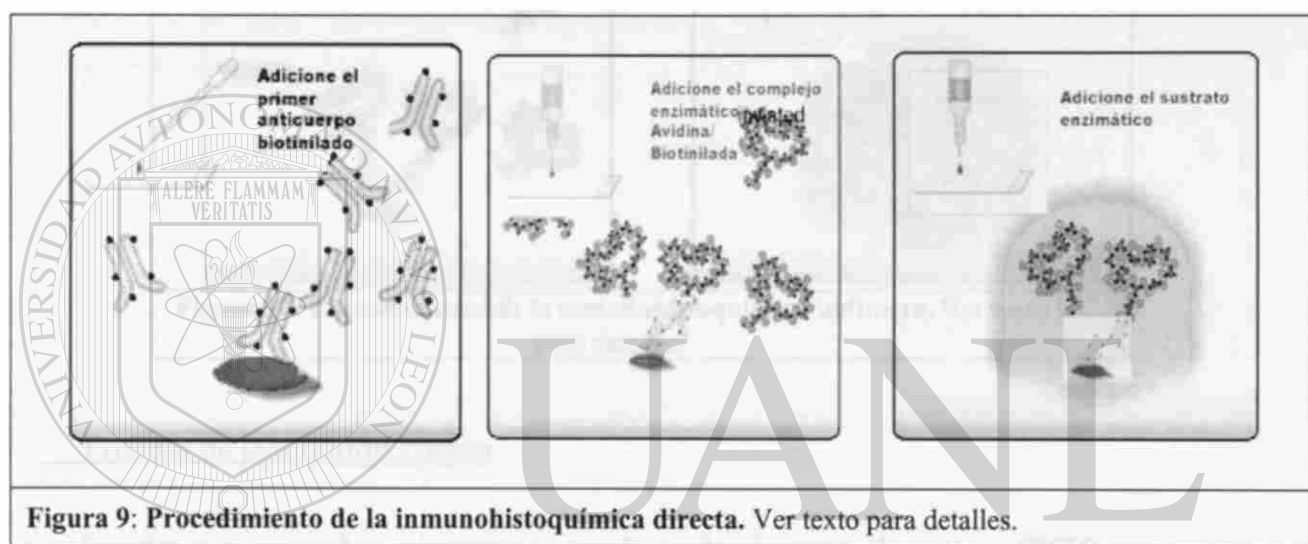
Una vez montados los cortes en portaobjetos fueron desparafinizados e hidratados; posteriormente se siguió el protocolo de la tabla III.

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

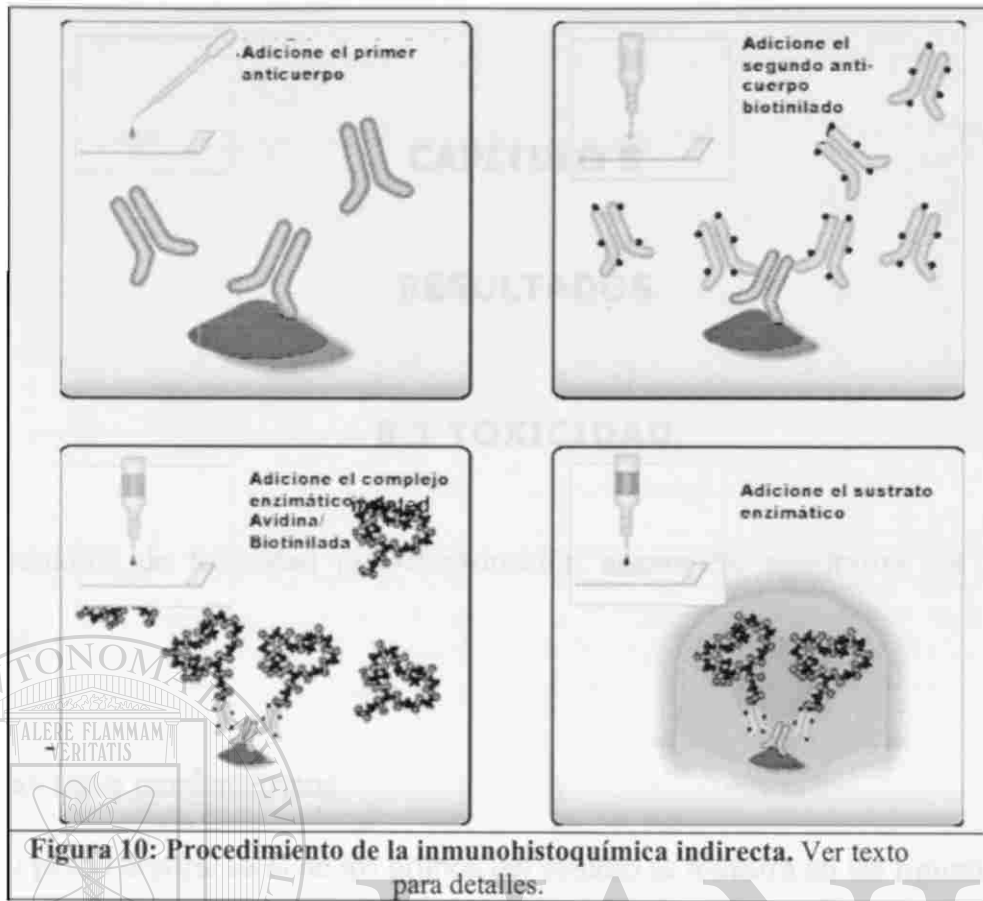
- *Directa.* Para realizar el análisis inmunohistoquímico se desparafinizaron e hidrataron las muestras. Estas fueron sometidas a recuperación antigénica con buffer de citratos (pH 6) y la actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada lavando las laminillas en peróxido de hidrógeno (3%) en metanol por 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).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

*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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 8

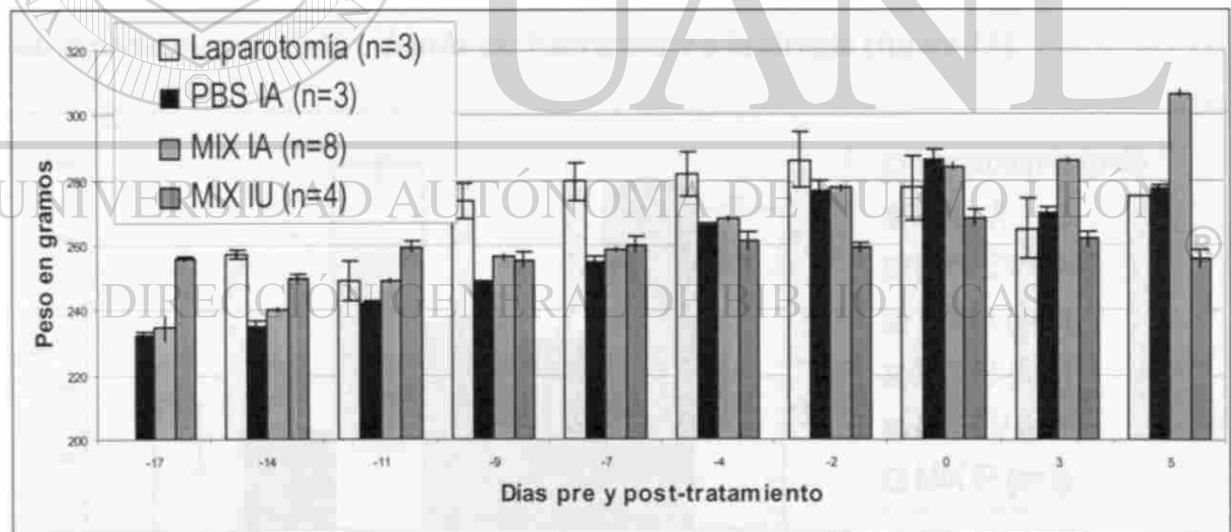
### RESULTADOS

#### 8.1 TOXICIDAD

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

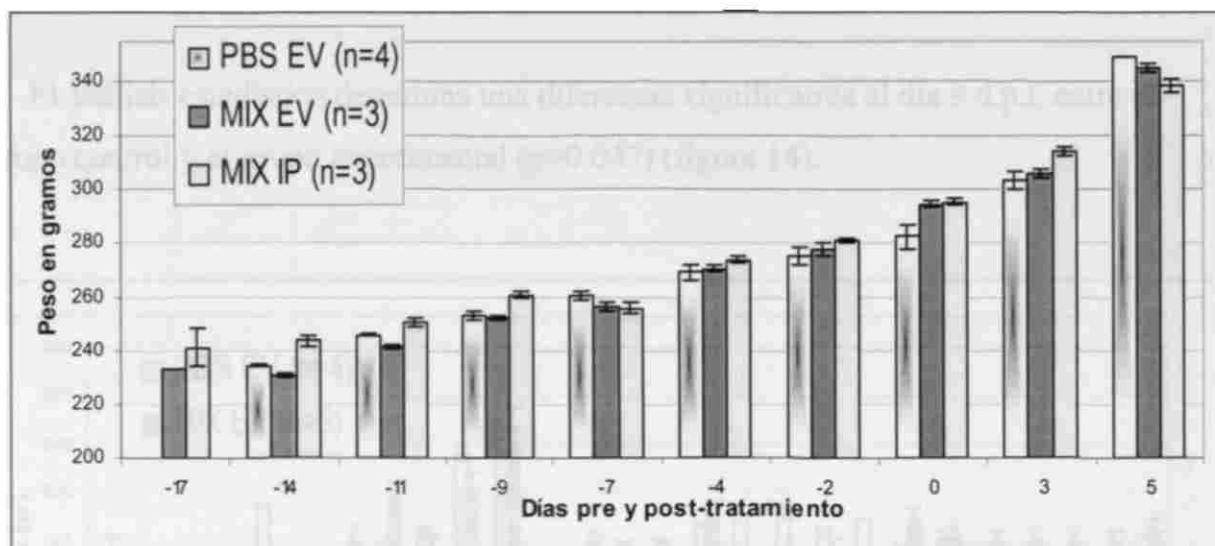
##### 8.1.1 Hallazgos morfométricos

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



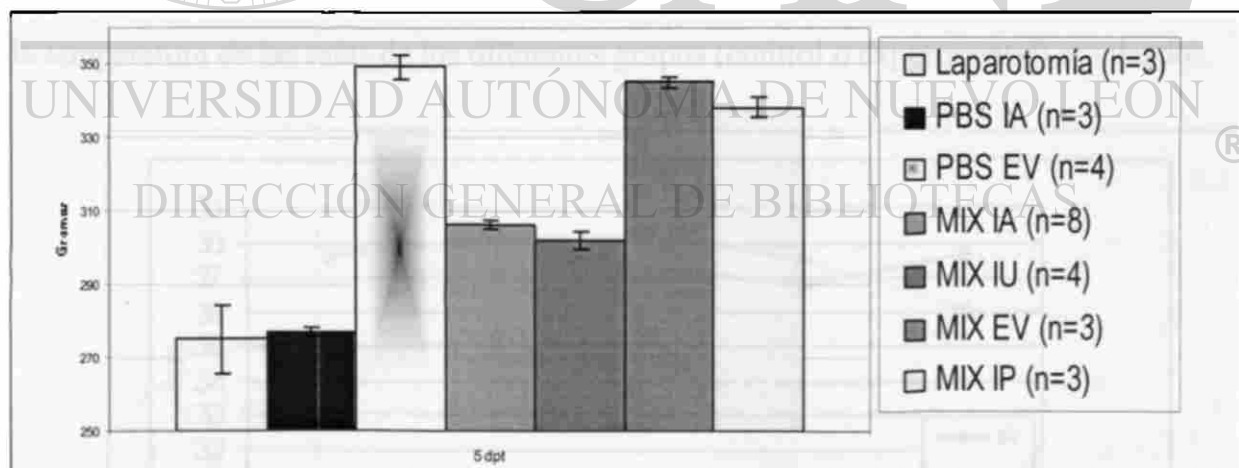
**Figura 11: Peso de ratas con cirugía.** Se grafica la media  $\pm$  error estándar de los grupos de ratas sometidas sólo al procedimiento de laparotomía y aquellas transducidas con PBS siendo ratas gestantes (PBS IA) conformando los grupos control. La tercer columna (MIX IA) representa a ratas gestantes 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.





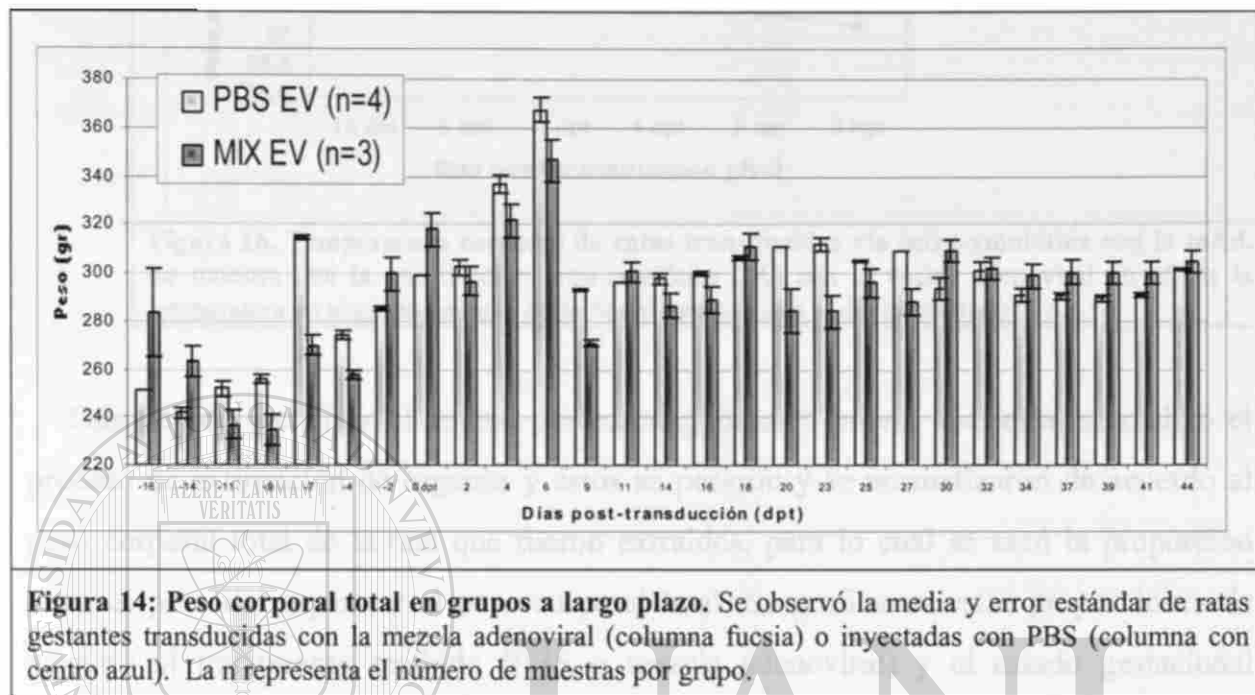
**Figura 12: Peso de ratas sin cirugía.** Se gráfica la media  $\pm$  error estándar del peso corporal de ratas gestantes transducidas por vías independientes de cirugía: endovenosa tanto con buffer de fosfatos (PBS EV) conformando el grupo control como con la mezcla adenoviral (MIX EV) y transducción 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).

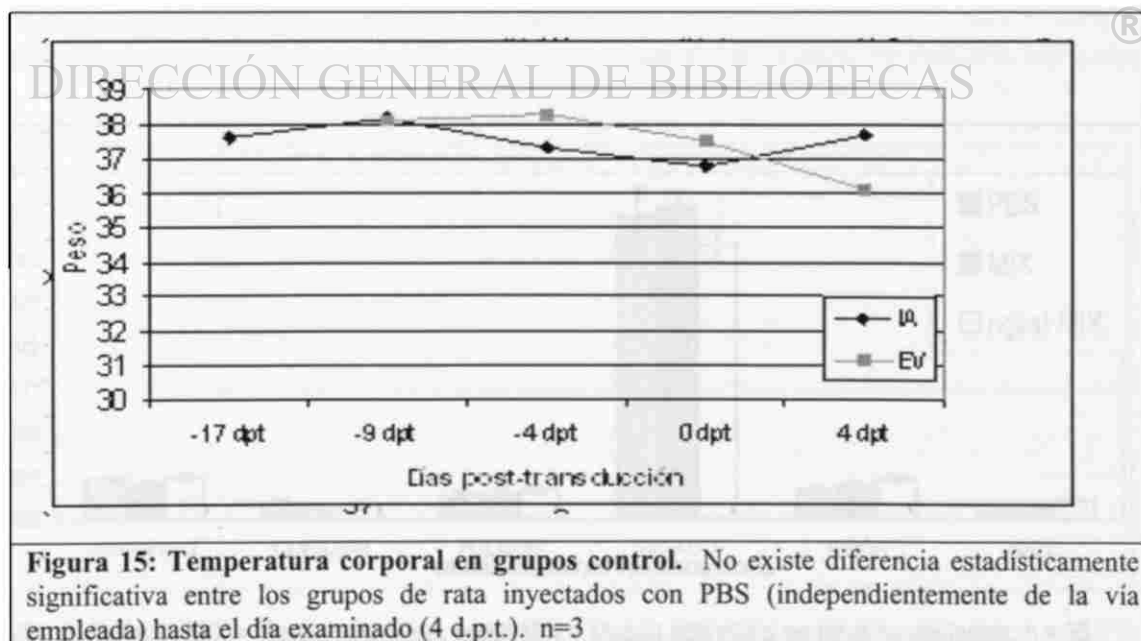


**Figura 13: Peso corporal al día 5 post-tratamiento (5 d.p.t.).** Las primeras 3 columnas representan la media aritmética de los grupos controles siendo la primer columna el grupo de ratas no gestantes sometidas a laparotomía, la segunda columna el grupo de ratas gestantes con laparotomía e inyectadas 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).



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.



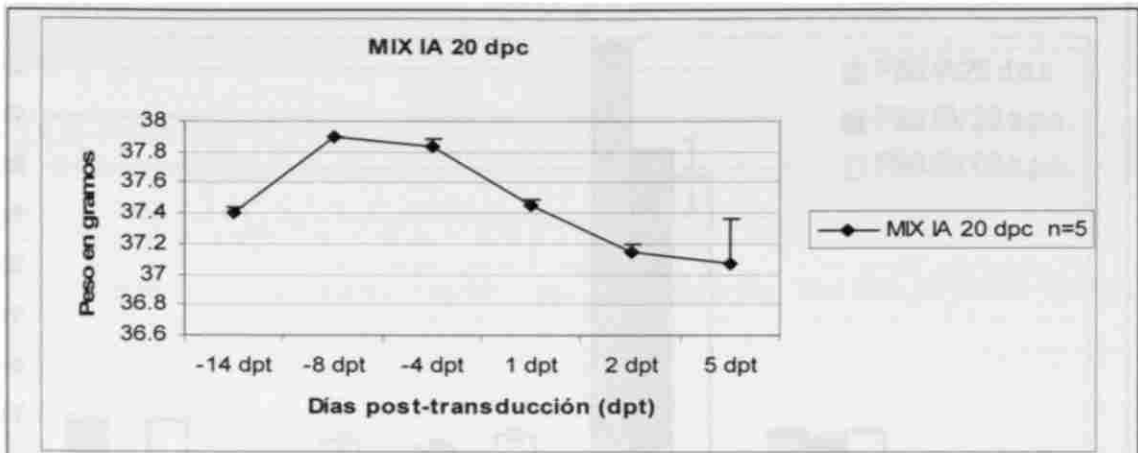
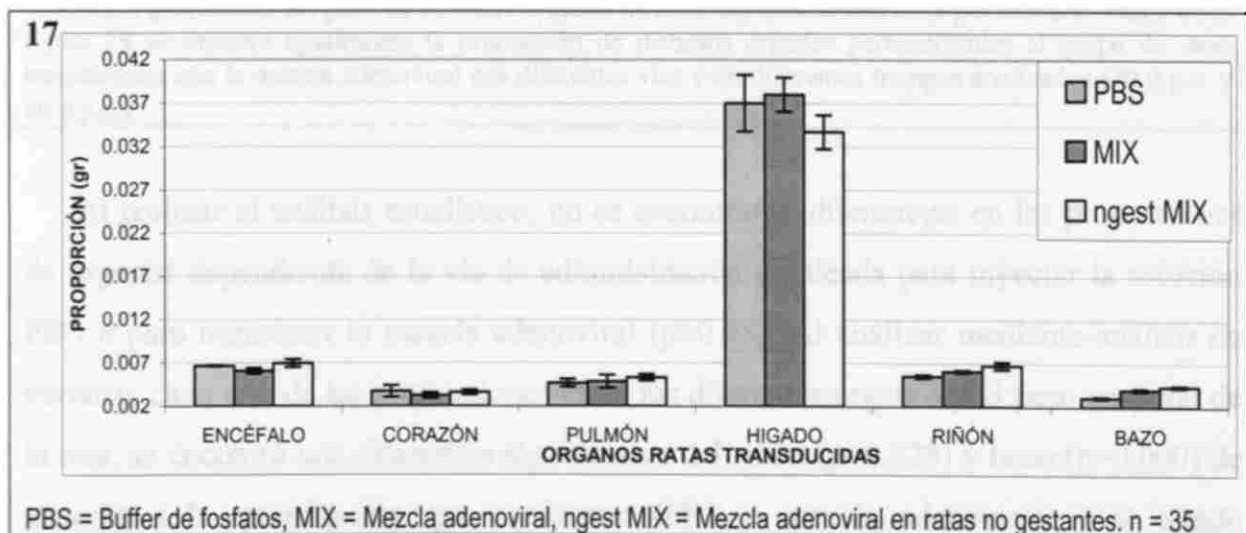


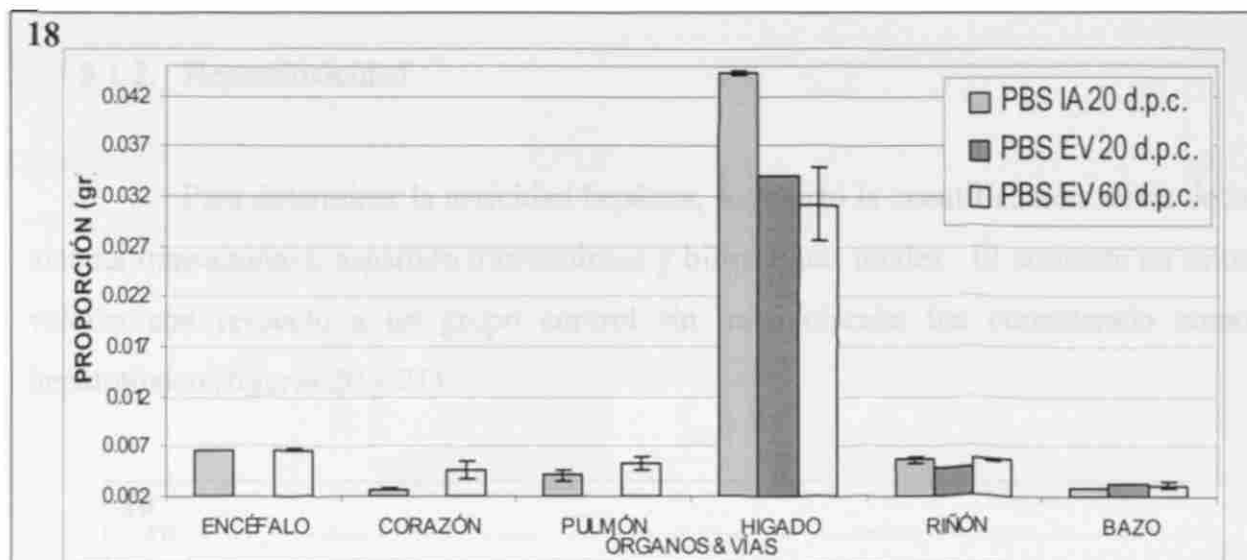
Figura 16. Temperatura corporal de ratas transducidas vía intra-amniótica con la mAd. Se muestra que la transducción intra-amniótica (IA) con el vector adenoviral no afecta la temperatura en el grupo de ratas gestantes al menos hasta el día examinado (5 d.p.t.).

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.

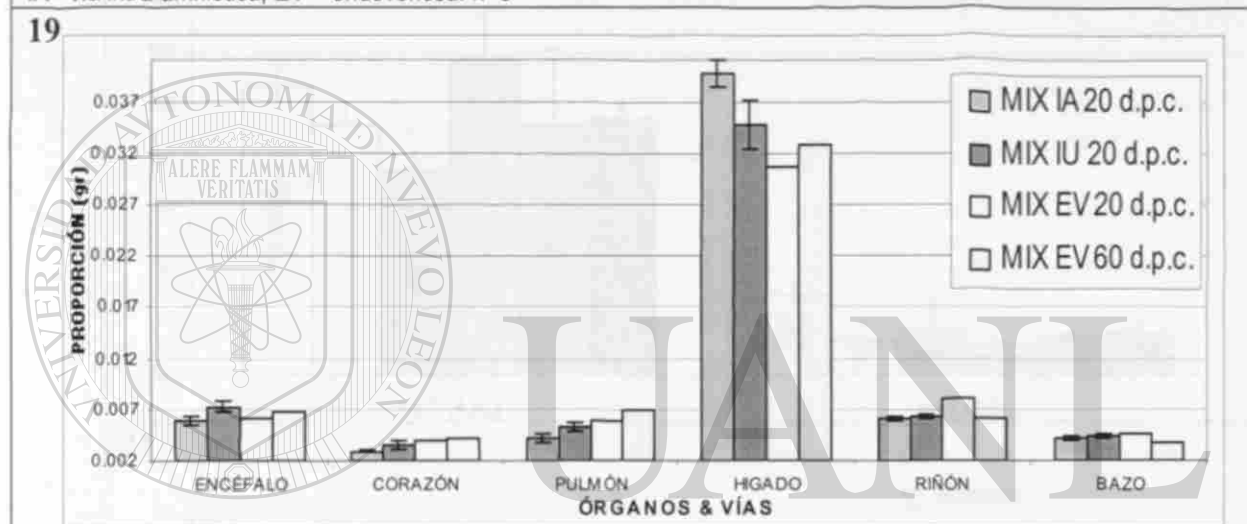
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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



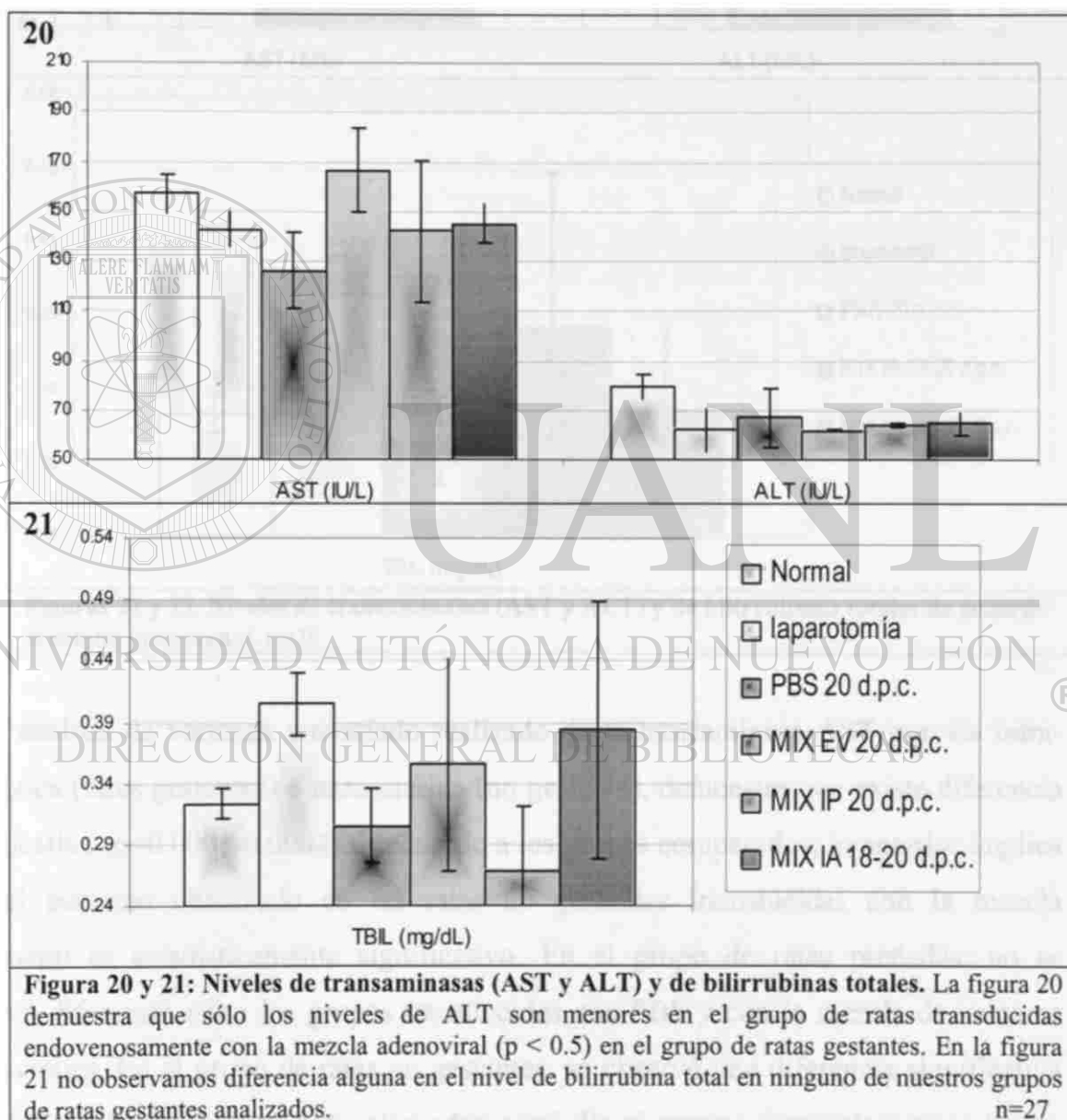
IA= intra-amniótica (gest), IU= intra-uterina (ngest), EV = endovenosa (gest). n=17

**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.).

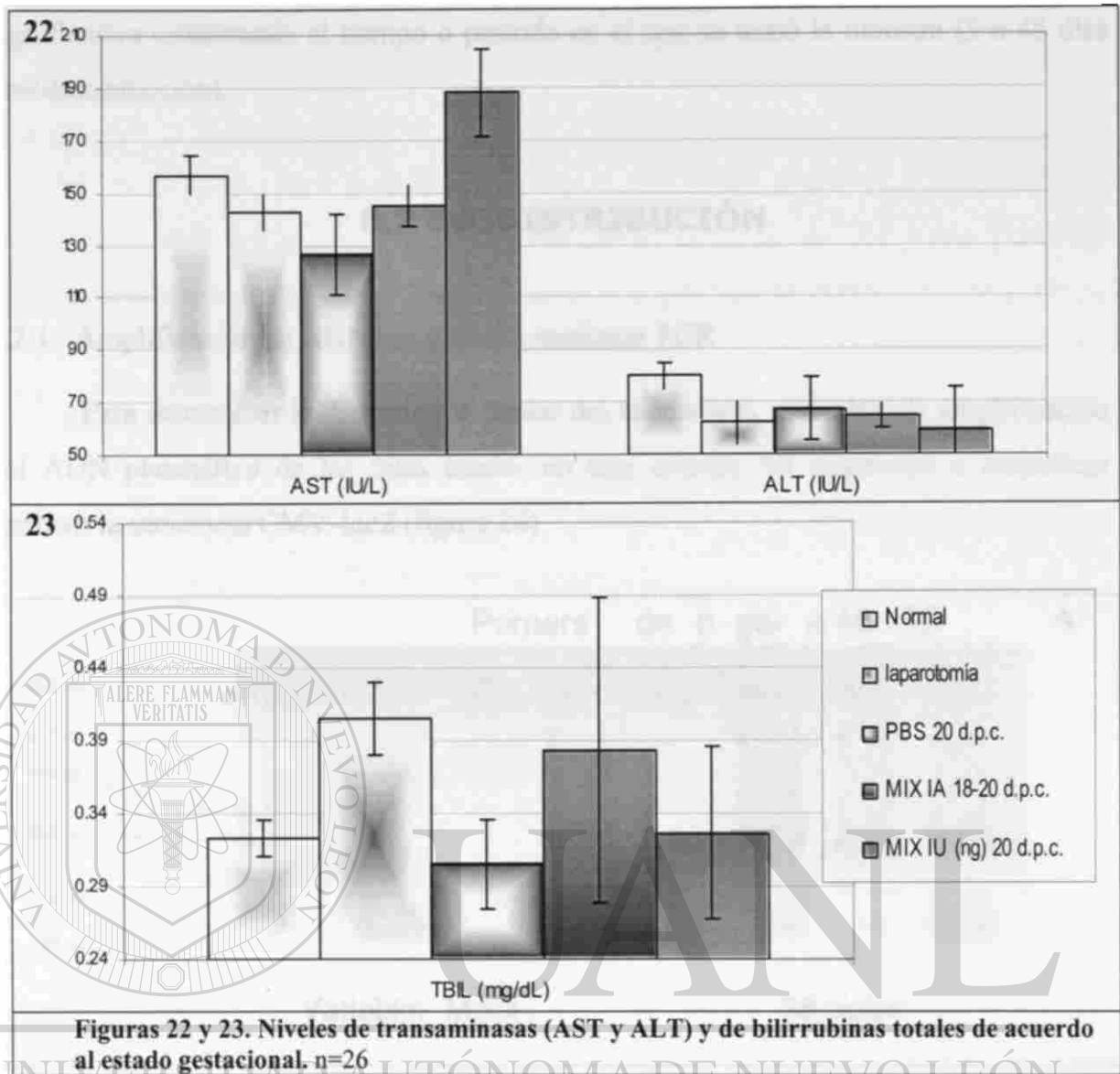
Al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias en las proporciones de órganos dependiente de la vía de administración empleada para inyectar la solución PBS o para transducir la mezcla adenoviral ( $p > 0.05$ ). Al analizar mediante análisis de varianza cada uno de las proporciones 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).



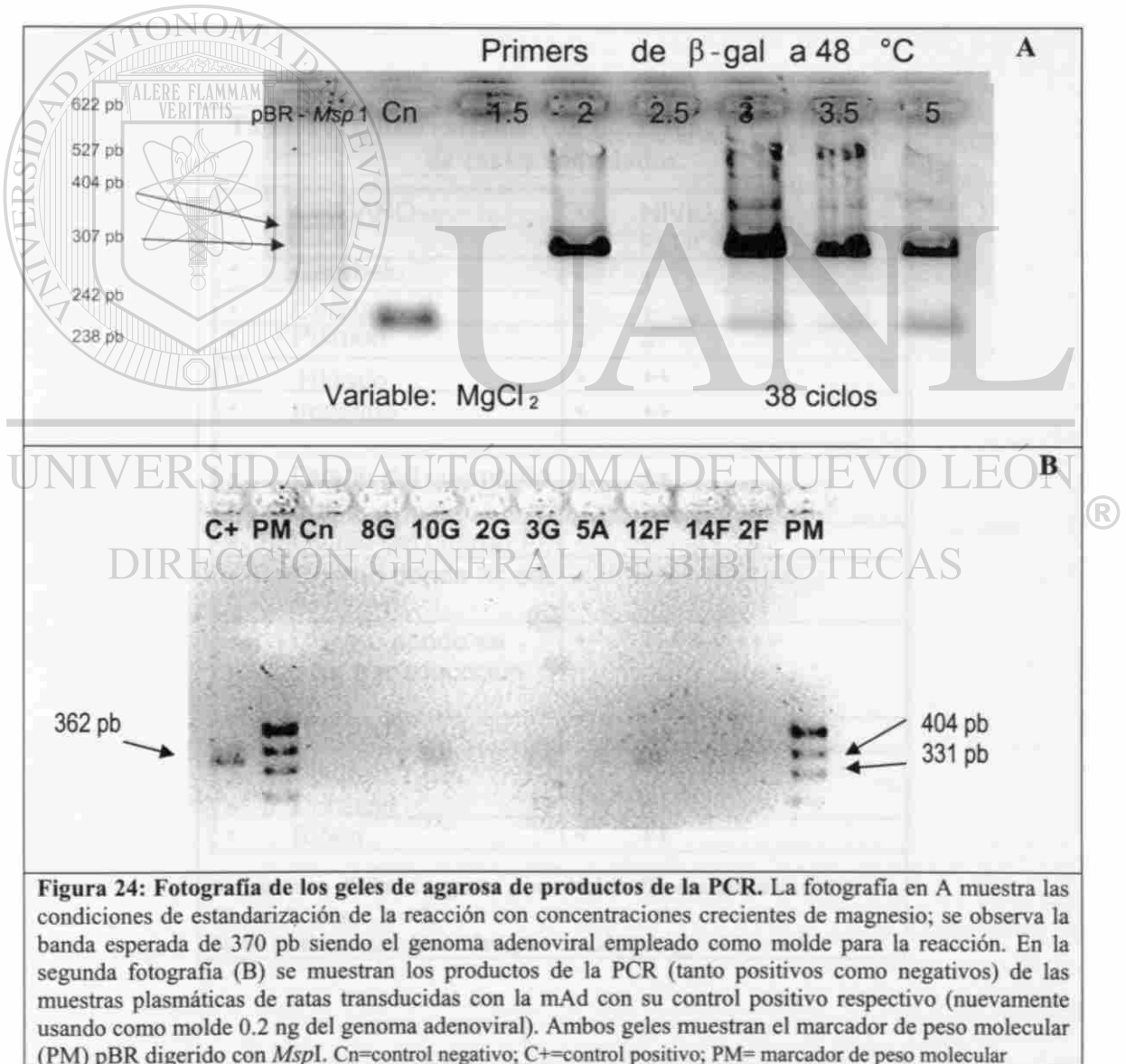
El análisis de varianza univariado realizado de la transaminasa AST por vía intra-amniótica (ratas gestantes) e intra-uterina (no gestante), demuestra que existe diferencia significativa ( $p=0.0001-0.0004$ ) de acuerdo a los grupos comparados; lo anterior implica que el aumento observado en las ratas 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).



**Figura 24: Fotografía de los geles de agarosa de productos de la PCR.** La fotografía en A muestra las condiciones de estandarización de la reacción con concentraciones crecientes de magnesio; se observa la banda esperada de 370 pb siendo el genoma adenoviral empleado como molde para la reacción. En la segunda fotografía (B) se muestran los productos de la PCR (tanto positivos como negativos) de las muestras plasmáticas de ratas transducidas con la *mAd* con su control positivo respectivo (nuevamente usando como molde 0.2 ng del genoma adenoviral). Ambos geles muestran el marcador de peso molecular (PM) *pBR* digerido con *MspI*. Cn=control negativo; C+=control positivo; PM= marcador de peso molecular

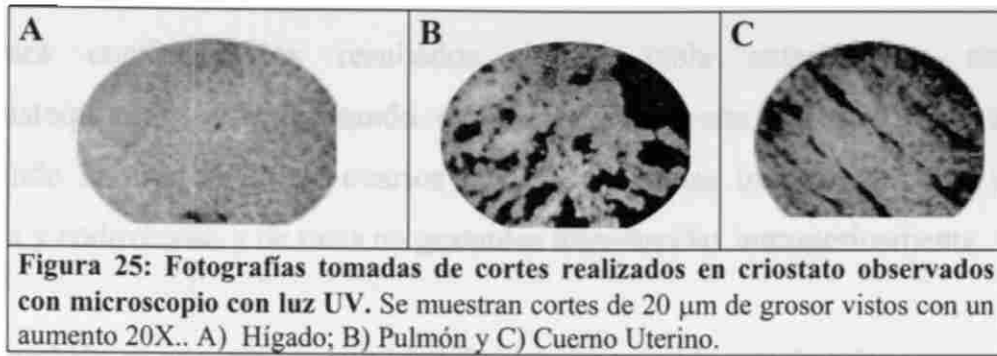
Se realizó la estandarización de las condiciones óptimas (de acuerdo a los oligos usados) para la PCR (figura 24A). Se obtuvo que el 30% de las muestras de las ratas transducidas por vía intra-amniótica e intra-uterina (ratas gestantes y no gestantes, respectivamente) fueron positivos; mientras que el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





### 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 Reprodutor	+ 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 Reprodutor	+
Cerebelo	+	Corazón	(IA) +++
Pulmón	(IA) + citoplásmico		
Higado	+++ 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%).

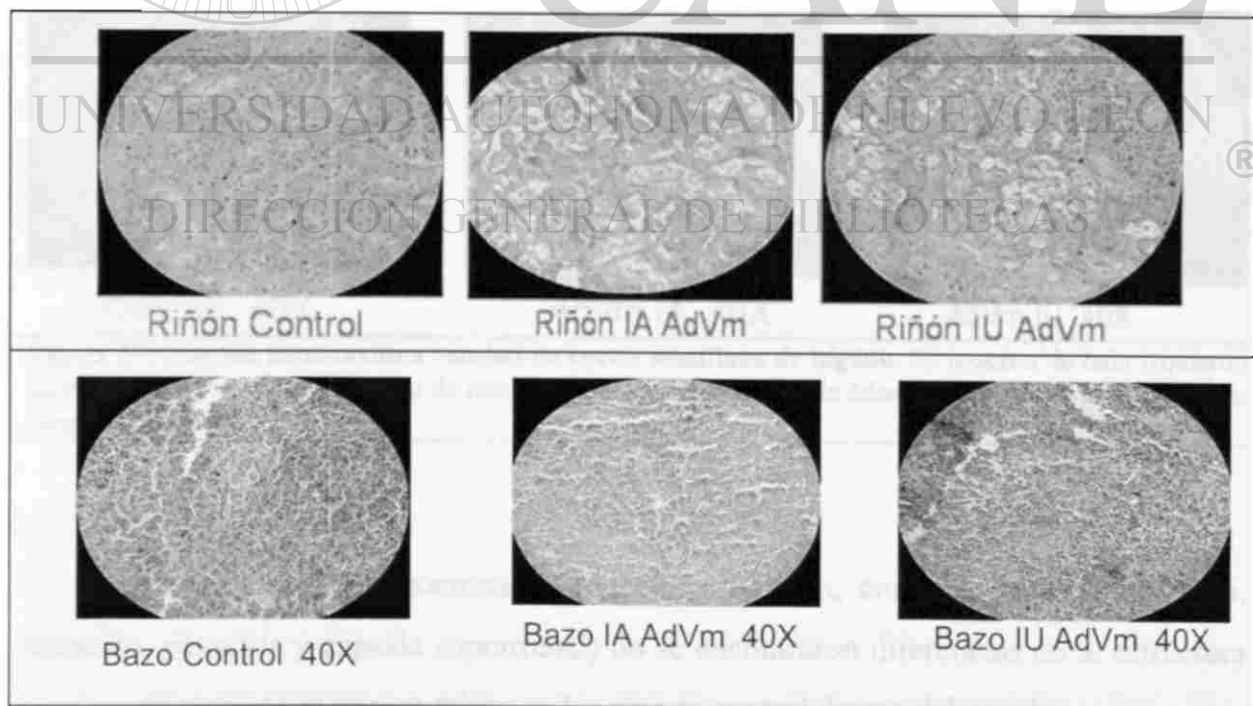
De los resultados de la tabla anterior, se deduce que la expresión o presencia de la proteína GFP fue mayor en hígado, corazón y riñón. Lo anterior es atribuible al gran tropismo adenoviral existente en estos órganos.

### 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 túbulos proximales y congestión glomerular;
- Bazo: Congestión sinusoidal y monoclonalidad celular.



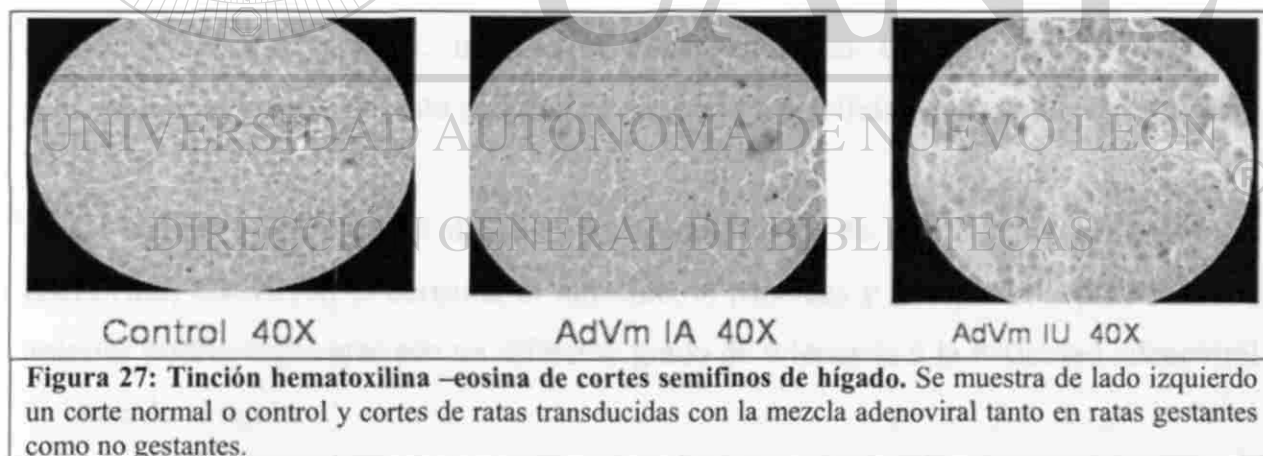
**Figura 26: Fotografías con hallazgos anatomopatológicos en riñón y bazo.** Cortes semifinos teñidos con hematoxilina y eosina de tejidos controles o normales de lado izquierdo y los siguientes cortes provenientes de ratas transducidas con la mezcla adenoviral en ratas gestantes y no gestantes, respectivamente. Observaciones realizadas con el 40x de aumento.

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, esto 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.

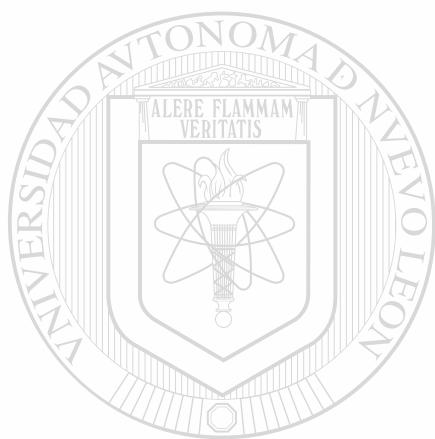
En la evaluación de los valores de laboratorio clínico obtenidos de AST, ALT y bilirrubinas totales, se encontró que la transducción con  $3 \times 10^{10}$  pv en ratas gestantes no produjo hepatotoxicidad al día evaluado (5 d.p.t.). Se observó diferencia significativa en el valor promedio de ALT en 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.



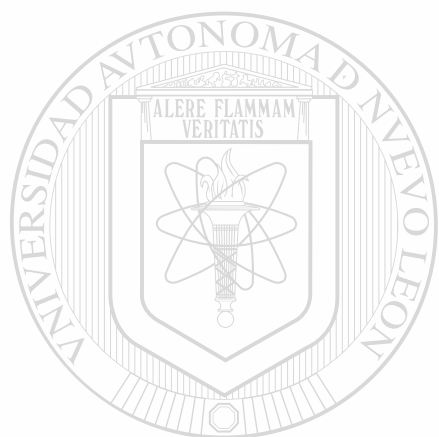
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





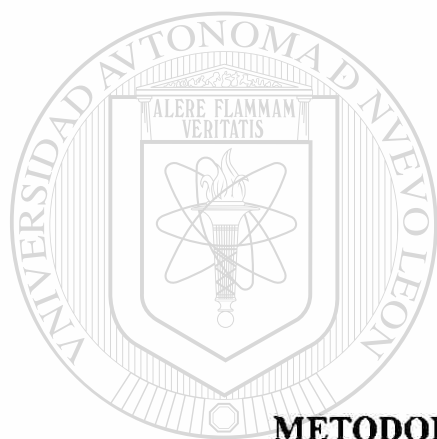
**ANEXOS**  
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**ANEXO A**

**METODOLOGÍA DE LA TERAPIA GÉNICA**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

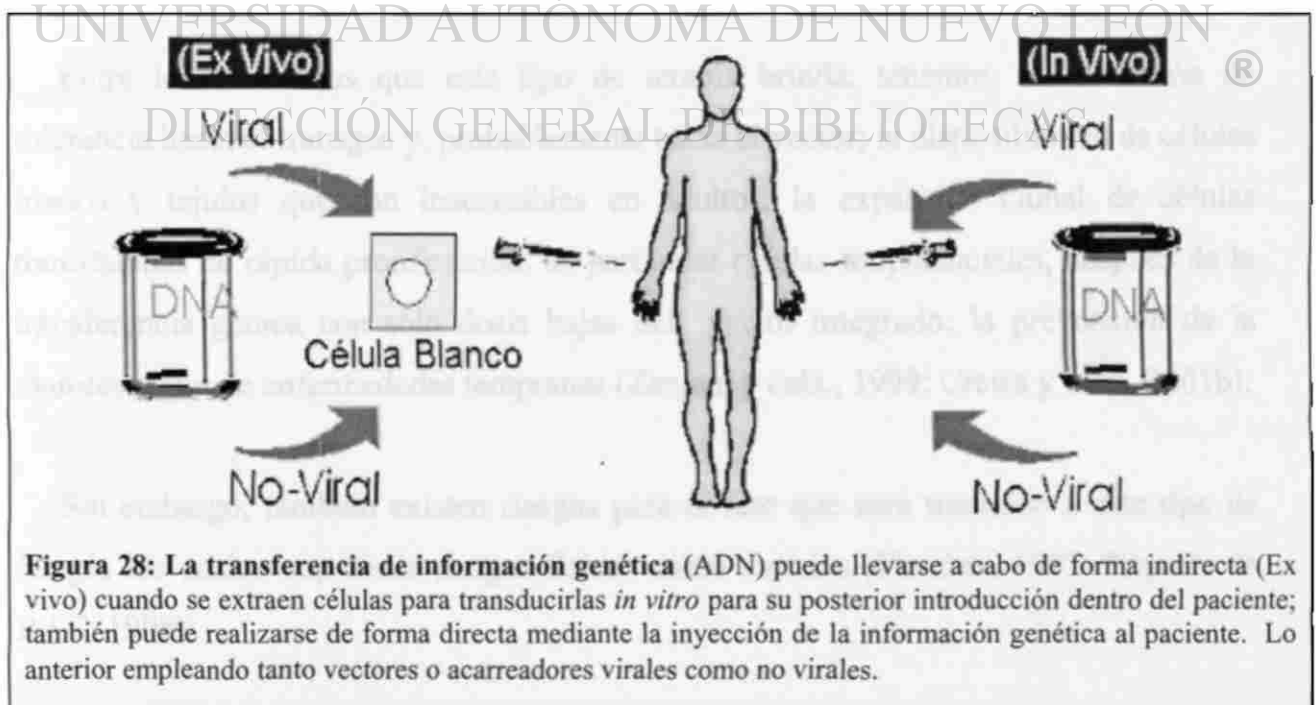


## ANEXO A

### 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 anomalías 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).

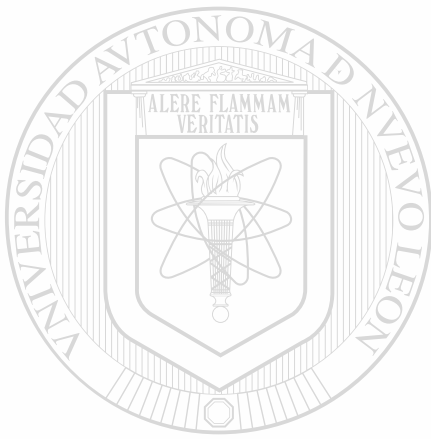
Entre los beneficios que este tipo de terapia brinda, tenemos: la inducción de tolerancia hacia el transgen y, probablemente hacia el vector; la disponibilidad de células blanco y tejidos que son inaccesibles en adultos; la expansión clonal de células transducidas de rápida proliferación, en particular 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.



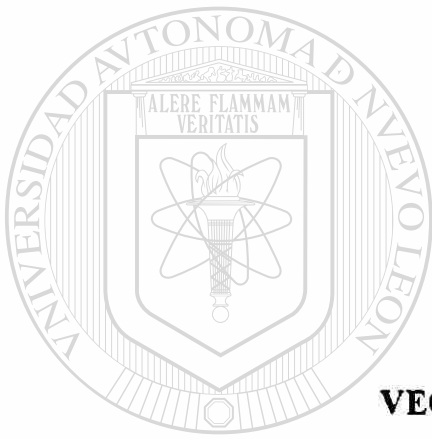
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**ANEXO B**

**VECTORES ADENOVIRALES**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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).



**Figura 29: Adenovirus:** Micrografía electrónica que muestra partículas teñidas negativamente de aproximadamente 80 nm de diámetro, aislados de heces. Se nota la típica estructura hexagonal producida por su estructura icosaédrica. Estos virus contienen un genoma de doble cadena lineal encapsulado en una cubierta proteínica icosaédrica de 70 a 100 nm de diámetro.. Las partículas pequeñas son virus adeno-asociados (satélites).

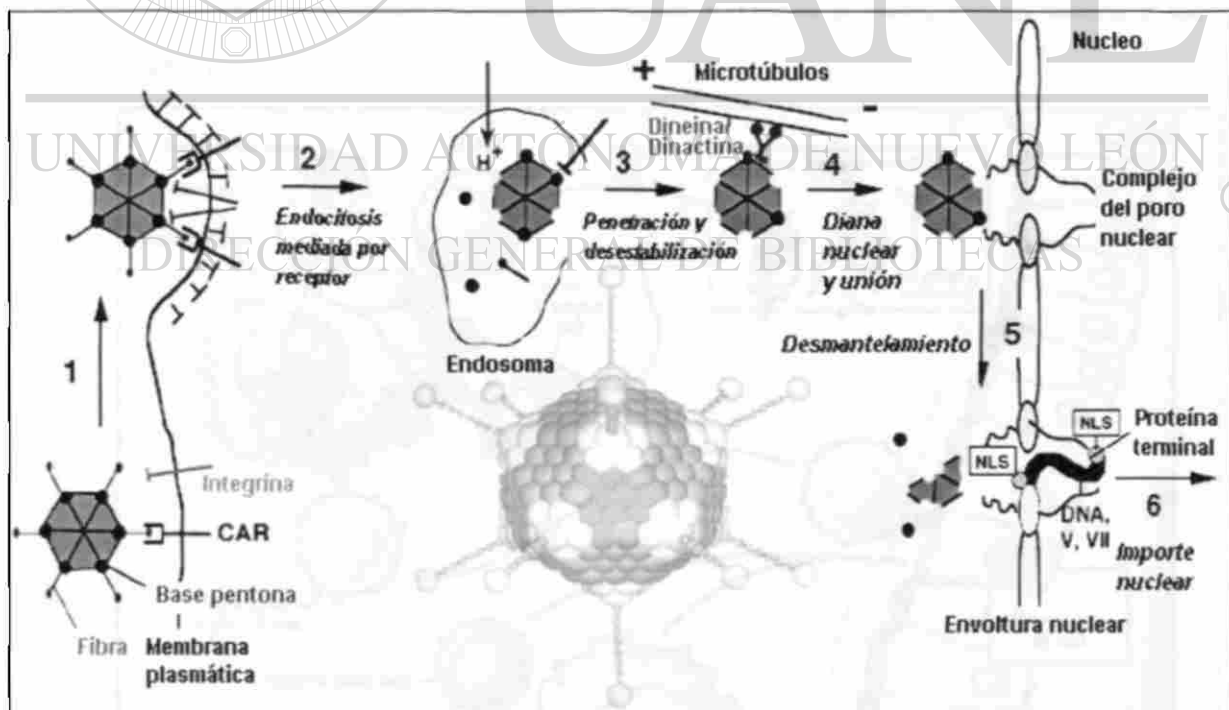
Numerosos estudios han demostrado que el tropismo adenoviral está determinado por el tipo de interacción existente entre la fibra de cada uno de los serotipos con receptores celulares, principalmente el receptor CAR e integrinas (Bergelson y cols., 1997; Dmitriev y cols., 1998).

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  $\alpha_3\beta_3$  y  $\alpha_5\beta_5$ . 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).

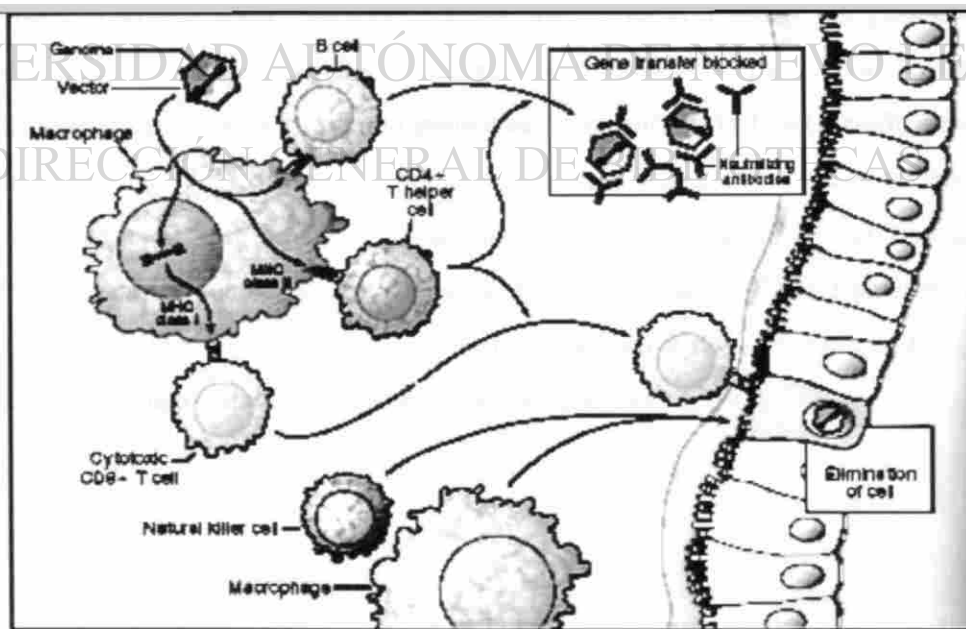
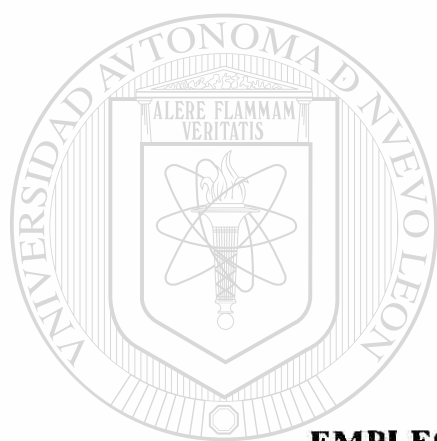


Figura 31: Respuesta inmune al adenovirus. En el esquema se muestra el papel de la respuesta celular y humoral despertada por las proteínas adenovirales.

### 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**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## ANEXO C

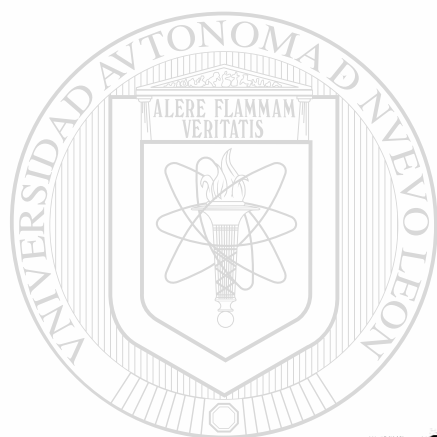
### EMPLEO DE GENES REPORTEROS

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**

UANL

**EL CICLO ESTRAL EN LA RATA**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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.

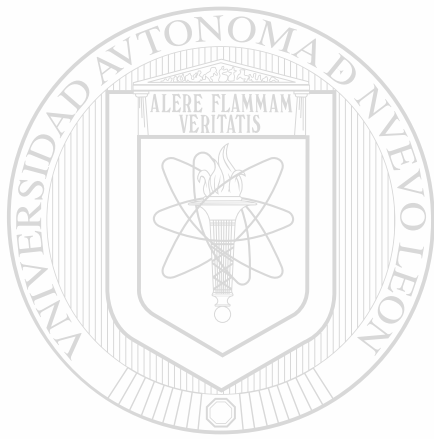
**DIESTRO.** También se rechaza al macho. Fase del cuerpo amarillo. Existe influencia de la progesterona luteínica sobre las estructuras sexuales accesorias. Dura 57 hrs.

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**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 1 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, Kovessi 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

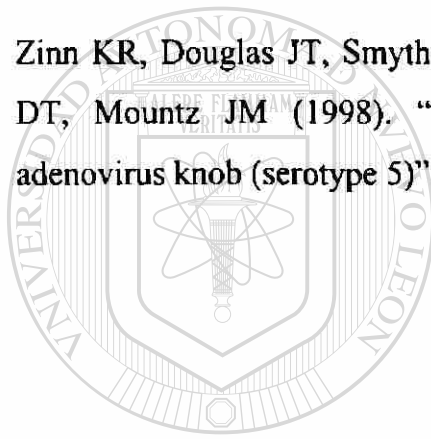
Woo YJ, Raju GP, Swain JL, Richmond ME, Gardner TJ, Balice-Gordon RJ (1997). "In utero cardiac gene transfer via intraplacental delivery of recombinant adenovirus". *Circulation* 96:3561-3569.

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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.

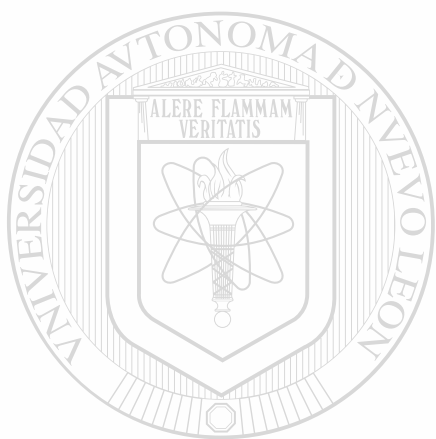
Padres: Dra. Bernarda Sánchez Flores y Dr. Aurelio Rueda Pimentel.

**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.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHYSICS DEPARTMENT

