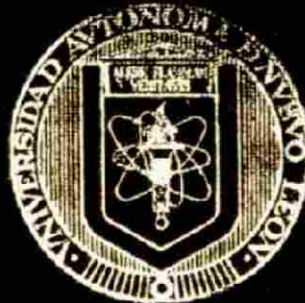


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**

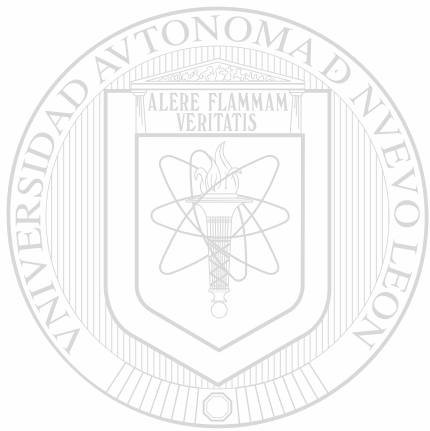


**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACION CON VECTORES
ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD
TERAPEUTICA Y LA TOXICIDAD DE LA
TERAPIA GENICA ANTITUMORAL**

**Por
M.C.P. ANDRES HERNANDEZ GARCIA**

**Como Requisito Para Obtener El Grado De DOCTOR
EN CIENCIAS Con Especialidad En Biología Molecular
e Ingeniería Genética**

**MONTERREY, NUEVO LEON
JUNIO DEL 2002**



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

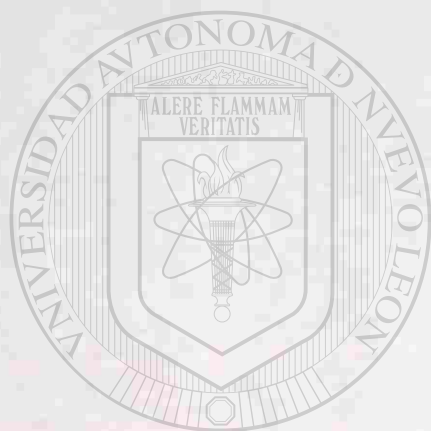
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
RM301
.3
.G45
H4
e.1



1080114182



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES
ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA Y LA
TOXICIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL**

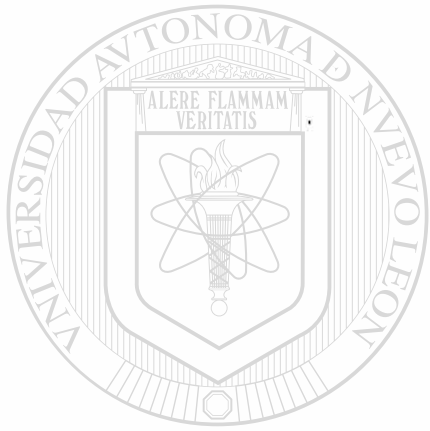
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR

M.C.P ANDRES HERNÁNDEZ GARCÍA

Como Requisito Para Obtener El Grado De **DOCTOR EN CIENCIAS**
Con Especialidad En Biología Molecular E Ingeniería Genética

MONTERREY, NUEVO LEÓN
Junio del 2002

TD
RM301
.3
.G45
H4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

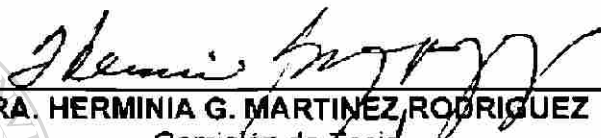


**EFFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES
SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA Y LA TOXICIDAD DE LA TERAPIA
GÉNICA ANTITUMORAL**

Aprobación de la Tesis:



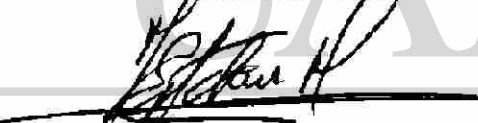
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. JUAN FRANCISCO GONZALEZ GUERRERO
Comisión de Tesis



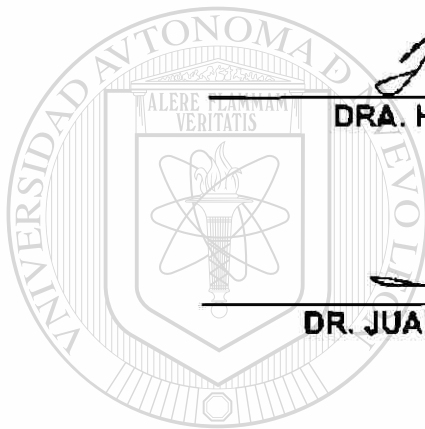
DR. JACINTO ESTEBAN MARIA
Comisión de Tesis



DR. GERARDO VELAZCO CASTAÑON
Comisión de Tesis



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

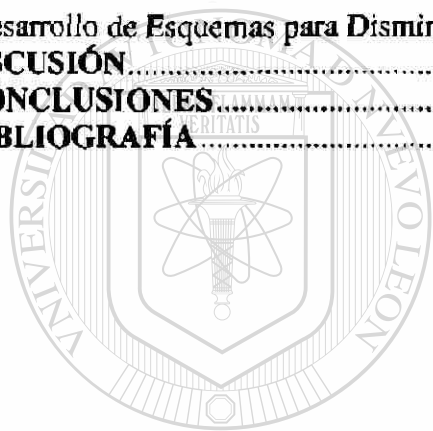


TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA

Agradecimientos.....	iv
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Figuras	vi
Resumen	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La Terapia Génica: Una Innovadora Estrategia Terapéutica	1
1.2 Terapia Génica Ex Vivo.....	1
1.3 Terapia Génica In Vivo	2
1.4 Los Primeros Intentos En El Campo De La Terapia Génica.....	3
1.5 El Surgimiento De Normas De Bioseguridad Para El Manejo Del ADN Recombinante.....	3
1.6 Requisitos Para Iniciar Un Programa De Terapia Génica.....	4
1.7 Estrategias Para La Transferencia Génica.....	5
1.8 Definición De Vector	6
1.9 Retrovirus Como Vectores En Terapia Génica	6
1.10 Adenovirus Como Vectores Recombinantes En Protocolos De Terapia Génica.....	9
1.11 Ventajas De Los Vectores Adenovirales En Terapia Génica.....	12
1.12 Principales Inconvenientes De Los Vectores Adenovirales.....	14
1.13 La Terapia Génica De Los Trastornos Genéticos	14
1.14 La Terapia Génica Suicida	15
1.15 Terapia Génica Profiláctica (Genoprofilaxis).....	18
2. ANTECEDENTES	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ETAPAS EXPERIMENTALES	22
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. HIPOTESIS	30
5.1 Hipótesis De Trabajo.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1 Objetivos Generales	31
6.2 Objetivos Particulares	31
7. MATERIAL Y METODOS.....	33
7.1 Material	33
7.1.1 Virus y Vectores.....	33
7.1.2 Animales.....	33
7.1.3 Líneas Celulares	34
7.2 Métodos.....	34
7.2.1 Ensayo De Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	34
7.2.2 Ensayo De Neutralización (Adenovirus Neutralization Assay).....	35
7.2.3 Ensayo De La Proteína Verde Fluorescente (GFP-Assay).....	36
7.2.4 Ensayo De Luciferasa.....	38
7.2.5 Tumorigénesis	39
7.2.6 Recolección De Tejidos	39
7.2.7 Recolección De Muestras De Suero.....	39
7.2.8 Análisis Enzimáticos.....	39
7.2.9 Estudio Anatomopatológico	40
7.2.10 Análisis Estadísticos.....	40

7.2.11	Diseño Experimental De La Primera Etapa De Investigación (Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros)	41
7.2.12	Diseño Experimental De La Segunda Etapa De Investigación (Investigación De Los Efectos De La Inyección Intratumoral De Dosis Crecientes De Adenovirus En Ratones Normales Y Preinmunizados.)	43
7.2.13	Diseño Experimental De La Tercera Etapa De Investigación (Disminución De La Inmunogenicidad De Los Vectores Adenovirales A Través De Su Encapsulación (Pegilación) Con Polímeros De Polietilenglicol.)	45
8.	RESULTADOS	47
8.1	Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros	47
8.2	Investigación de los Efectos de la Inyección Intratumoral de Dosis Crecientes de Adenovirus en Ratones Normales y Preinmunizados.	57
8.3	Desarrollo de Esquemas para Disminuir la Inmunogenicidad de los Vectores Adenovirales	65
9.	DISCUSIÓN	68
10.	CONCLUSIONES	75
11.	BIBLIOGRAFÍA	77



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE, en reconocimiento a su abnegación, ternura y calidad humana.

A MI PADRE, el Sr. Andrés Hernández García. Con admiración y cariño

A quien es motivo de mi vida, mi alegría y mis más puros sentimientos, MI ESPOSA

Patricia de la Peña de Hernández.

Para MIS HIJOS: Alessandra, Andrés, Alberto y Alejandro, quienes son el fundamento de mis anhelos, mis principios, mis propósitos y mi futuro.

A MIS HERMANOS con el deseo de que continúen en el camino de la honestidad y la humildad.

Para el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, con gratitud por su irrestricto apoyo moral y por depositar su confianza en mi formación profesional, distinguiéndome con su desinteresada amistad.

Al Dr. Estuardo Aguilar-Cordova, por brindarme la oportunidad de culminar mi trabajo de tesis dentro de su laboratorio y enseñarme los innovadores métodos de la terapia génica, en un ambiente de amistad, cordialidad y entusiasmo.

A la Doctoras Herminia G. Martínez Rodríguez y Agnes Revol de Mendoza por su amistad, interés y comprensión a lo largo de mi formación profesional dentro de la ULIEG.

A la comisión de Tesis: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Dr. Augusto Rojas Martínez, Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, Dr. Gerardo Velazco Castañón, Juan F. González Guerrero y Dr. Jacinto Esteban María.

Al Ing. José María Fraustro Siller, Actual Subsecretario de Educación Pública y Ex-Rector de la Universidad Autónoma de Coahuila, por su distinguida amistad e inquebrantable apoyo durante los momentos más difíciles de mi desarrollo profesional.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, Director de la Facultad de Medicina de la UANL por sus oportunas palabras de aliento, compañerismo y amistad demostrados durante esta importante etapa de mi vida.

A los funcionarios de la U.A. de C. Lic. Mario A. Ochoa Rivera, Ing. Jesús Mendoza Rodríguez, y Arq. Javier Reyes Engstrom, por su amistad y todas las atenciones recibidas.

A MIS AMIGOS de Houston Texas y a todos los integrantes del Gene Vector Laboratory por hacer mi estancia en los USA agradable y placentera.

A mis amigos de la ULIEG, por la solidaridad mostrada durante la realización de mis actividades de investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Universidad Autónoma de Coahuila y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante la realización de mi Doctorado.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: Enzima Adenosin-deaminasa.
ALT: Enzima Alanin Amino Transferasa.
APSE Antígeno Prostático Seroespecífico.
AdVFT2M59: Adenovirus carente de genes que codifican para proteínas reporteras.
AdV-GFP: Adenovirus portador del gen que codifica para la proteína verde fluorescente.
AdV-Luc: Adenovirus portador del gen que codifica para la enzima luciferasa.
AdV-Luc+MPEG: Adenovirus recubierto con mono-metoxipoli(etilenglicol).
AdV-Luc+TMPEG: Adenovirus recubierto con tresil-monometoxi polietilenglicol.
AdV-5: Adenovirus recombinante tipo 5
ADN: Ácido Desoxirribo-Nucleico complementario
ALP: Enzima Fosfatasa Alcalina.
AST: Enzima Aspartato Amino Transferasa.
CFTR: Regulador de Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística.
CMV: Citomegalovirus.
CPE: Efecto Citopático.
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
env: Gen que codifica para los componentes de la envoltura del virión.
FSK: Células murinas del epitelio mamario.
gag: Gen que codifica para una poliproteína destinada a formar la cubierta interior del retrovirus.
GCV: Ganciclovir.
GFP: Proteína Verde Fluorescente.
GVL: Gene Vector Laboratory.
HSV-TK: Virus del Herpes Simple portador del gen de la Timidin Kinasa
IL-2: Interleucina 2.
IT: Intratumoral.
pol: Gen que codifica para la enzima transcriptasa reversa.
LTR: Long Terminal Repeats.
Luc: Luciferasa.
MEM: Medio de cultivo esencial mínimo
MPEG: Monometoxipoli(etilenglicol).
NIH: Institutos Nacionales de Salud.
PBS: Amortiguador de fosfatos (Phosphate Buffer Solution)
PEG: Polietilenglicol.
UCLA: University of California-Los Angeles.
RAC: Recombinant DNA Advisory Committee.
RAG-2: Cepa de ratones inmunodeficientes.
RPM: Revoluciones por minuto.
RSV: Virus del Sarcoma de Rous.
SMH: Sistema Mayor de Histocompatibilidad.
SNC: Sistema Nervioso Central.
TCID50: 50% de la dosis infectiva en cultivo de tejido.
TM40-D: Línea celular que produce tumores mamarios en el ratón.
TMPEG: Tresil-mono metoxipoli(etilenglicol).
TK: Enzima Timidin Kinasa.
V.P/tumor: Número de partículas virales por tumor.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Estrategias de terapia génica.....	2
Figura 2. Genoma Retroviral.....	7
Figura 3. Mecanismo de integración de Retrovirus	8
Figura 4. Fabricación de adenovirus recombinantes.....	12
Figura 5. Mecanismo de acción del Ganciclovir.....	17
Figura 6. Terapia Génica Profiláctica	19
Figura 7. Interferencia inmunológica en la terapia génica con vectores adenovirales.....	21
Figura 8. Patrón de diseminación y hepatotoxicidad de un AdV-vector que codifica para luciferasa	23
Figura 9. Escenarios de hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado	24
Figura 10. Inyección Intratumoral de Megadosis de Adv-Luciferasa.....	25
Figura 11. PEGilación de Adenovirus.	27
Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA	35
Figura 13. Microfotografía de células tumorales transducidas con AdV-GFP	37
Figura 14. Representación esquemática del ensayo de Luciferasa	38
Figura 15. Diseño Experimental de la Primera Etapa	41
Figura 16. Estrategia General de la Primera Etapa	42
Figura 17. Estrategia General de la Segunda Etapa	44
Figura 18. Estrategia General de la Tercera Etapa.....	46
Figura 19. Gráfico de los Títulos de Anticuerpos Contra rAdV-5 Por ELISA.....	48
Figura 20. Titulación de Anticuerpos Neutralizantes en contra de rAdv-5	49
Figura 21. Actividad de Luciferasa en el Grupo Control durante los días 16, 21 y 28.....	50
Figura 22. Actividad de AdV-Luc en Ratones Normales y Preinmunizados.....	52
Figura 23. Expresión Intratumoral de AdV-Luc en los grupos de estudio	52
Figuras A, B y C. Expresión de la Proteína Verde Fluorescente en diferentes grupos.....	53
Figura 24. Actividad de Luciferasa en los tres grupos de estudio.....	55
Figura 25. Actividad de Luciferasa en el grupo de animales preinmunizados	56
Figura 26. Expresión de AdV-Luc como una función de la dosis en animales Controles	57
Figura 27. Expresión de AdV-Luc como una función de la dosis en animales Preinmunizados	58
Figura 28. Expresión de Luciferasa en Animales Preinmunizados e Inoculados Con Dosis Crecientes de AdV/Luciferasa.....	59
Figure 29. Tasa Tumor/Hígado de Expresión de AdV-Luc en Ratones Control.....	60
Figura 30 Tasa Tumor-Hígado en el Grupo de Ratones Preinmunizados	61
Figura 31. Títulos de Anticuerpos en relación a las dosis crecientes de AdV-Luc.....	62
Figura 32. Hepato-Toxicidad de Adenovirus	63
Figura 33. Títulos de Enzimas Hepáticas en los Grupos de Estudio.....	64
Figura 34. Títulos de Anticuerpos en contra Adenovirus Encapsulados con polímeros de Poli-etilen-glicol	65
Figura 35. Actividad de Luciferasa en Día 16 en Ratones Preinmunizados con AdV-FT2M59 y Adenovirus Encapsulados con Polímeros de PEG.....	67
Tabla 1. Titulación de Anticuerpos en contra de rAdv-5 por ELISA	48
Tabla 2 Titulación de Anticuerpos Neutralizantes en contra de rAdv-5.....	49

RESUMEN

Andrés Hernández García
Universidad Autónoma De Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Marzo del 2002

Área de Estudio: Terapia Génica e Inmunología de los Vectores Adenovirales.

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de Páginas: 83

Título del Trabajo: "EFECTO DE LA PRE-INMUNIZACIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES SOBRE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA Y LA TOXICIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL"

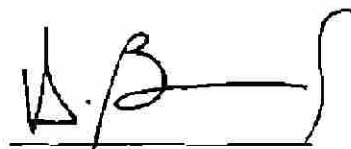
Objetivo: Determinar si la inyección intratumoral de adenovirus portadores de genes reporteros induce, o no, la producción de anticuerpos en contra del vector, y establecer si la presencia de éstos influye en la efectividad terapéutica y toxicidad de la terapia génica del cáncer mediada por vectores adenovirales.

Material y Métodos: El modelo animal de laboratorio utilizado, consistió de una fenocopia de tumores ortotópicos en ratones Balb/c. Cada animal fue inoculado vía subcutánea con células TM40-D a una concentración de 1×10^6 . Después de 3-4 semanas de tumorigénesis, los animales experimentales fueron inmunizados por la inyección intra-tumoral de dos diferentes vectores virales (ADV-GFP o AFT2M59) a una dosificación de 1×10^{11} partículas virales (v.p) /20 μ l; mientras que al grupo control se le inyectó con PBS. Catorce días más tarde, ambos grupos de animales recibieron una inyección intratumoral de un nuevo vector portador del gen de la luciferasa (AdV-Luc), con un rango de dosis que fluctuó entre 2×10^9 a 2×10^{11} p.v./tumor. Los niveles de expresión de AdV-Luc dentro del tumor y en tejidos normales fueron evaluados en función del tiempo (días 2, 7 y 14 después de la administración de AdV-Luc) y la dosis administrada. Para este propósito, se utilizó el ensayo de Luciferasa. Para la cuantificación de anticuerpos contra Adenovirus se utilizó el ensayo de ELISA. Para el estudio de cito-toxicidad, los tejidos fueron evaluados por medio de estudios enzimáticos y anatomo-patológicos. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de Varianza y la prueba "T" de Student.

Resultados: La preinmunización provocó una disminución significativa en la expresión de luciferasa en todos los tejidos, principalmente dentro del tumor (23 X) y a nivel hepático (800 X), durante todos los tiempos de estudio. Sin embargo, en el grupo control, no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la expresión de Luc (en el día 16) entre tumor, hígado, bazo y ovarios, lo cual indica la diseminación sistémica del vector. Por otro lado, en los grupos de animales pre-inmunizados, la expresión de AdV-Luc a nivel tumoral fue significativamente mayor comparada con hígado (33 X), bazo (131 X) y ovario (55 X). Los títulos de anticuerpos contra adenovirus fueron más elevados en los animales pre-inmunizados, indistintamente del tiempo de estudio ($p < 0.11$). El pico de mayor elevación se observó 7 días después de la inyección de AdV-Luc en ambos grupos. El incremento de la actividad de luciferasa relacionado con la dosis, sólo fue observado en los animales preinmunizados. Específicamente, se pudo observar un incremento 30 veces mayor en la actividad de luciferasa en los grupos de mayor dosificación. Notablemente, la expresión intratumoral de luciferasa en estos grupos fue comparable con aquella observada en los animales controles. En el grupo preinmunizado se notó una significativa disminución en la expresión hepática de AdV-Luc, comparada con la de los controles. Sin embargo, no se observó ningún incremento relacionado con la dosis. A diferencia de los animales controles, todos los ratones preinmunizados exhibieron evidencia histológica de hepatitis, la cual fue corroborada por un incremento en los títulos de las enzimas hepáticas.

Conclusiones: En los animales no inmunizados la diseminación de los vectores adenovirales desde el sitio de la inyección es homogénea y de carácter sistémico. La preinmunización ocasiona una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada con la expresión dentro del tumor. El uso de dosis elevadas de vectores virales en animales con inmunidad pre-existente, restituye los niveles de expresión intratumoral a niveles comparables con los observados en animales controles. Sin embargo, los fenómenos de toxicidad hepática observados en los animales pre-inmunizados necesitan ser estudiados con más detalle, debido a las enormes implicaciones terapéuticas que los vectores adenovirales tienen en el tratamiento del cáncer.

Palabras Clave: Adenovirus, Terapia Génica, Preinmunización, Toxicidad, Inmunidad pre-existente.



Dr. Hugo A. Herrera Saldaña
Asesor

ABSTRACT

Objective: Preimmunization to adenoviruses may influence the therapeutic effectiveness and toxicity of adenoviral-mediated gene therapy for cancer. This study was undertaken to evaluate the impact of intratumoral preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity.

Materials and Methods: The levels and duration of adenoviral (AdV) vector expression was evaluated in a subcutaneous mouse mammary cancer model of naive and preimmunized animals. BALB-C mice were injected subcutaneously with syngeneic TM40-D mouse mammary cancer cells (1×10^6 /50 μ l media). After 21 days of tumorigenesis, preimmunization was achieved by intratumoral injection of a gutless AdV vector (1×10^{11} v.p./tumor). Fourteen days later both naive and preimmunized groups of mice received an intratumoral injection of AdV bearing the luciferase reporter gene (AdV-Luc), at doses ranging from 2×10^9 to 2×10^{11} v.p./tumor. The levels of AdV-Luc expression in tumors and normal tissues as a function of time (days 2,7 and 14 after AdV-Luc injection) and AdV dose, were assessed with the Luciferase assay, and ELISA was used to quantitate AdV antibodies. Tissue histological changes and hepatic enzymes were used to evaluate normal tissue toxicity. Statistical analysis was conducted using Student's T-Test and Analysis of Variance.


Results: Preimmunization resulted in statistically significant lower luciferase expression in tumor (23-fold) and liver (800-fold). Preimmunized animals also demonstrated more pronounced decreases in liver luciferase expression by a minimum of 808-fold compared to tumor (minimum of 56-fold) at all time points. AdV antibody titers were higher in reimmunized animals at all time points and maximally increased one week after AdV-Luc injection in both groups. AdV dose related increases in intratumoral luciferase expression were observed only in preimmunized animals. Specifically, higher AdV doses, above 2×10^{10} v.p./tumor, increased intratumoral luciferase expression to levels comparable to those of naive animals. In liver, significant AdV dose related luciferase increase by 4000-fold was observed only for naive animals while preimmunization resulted in low levels of liver luciferase activity comparable to that of low dose naive group ($p > 0.424$). In contrast to naive animals, all preimmunized animals developed histologic evidence of grade 2-3 hepatic toxicity which was also reflected by increases in the average values of hepatic enzymes.

Conclusions: A preferential decrease in adenoviral vector expression is observed in liver compared to tumor after preimmunization. Higher adenoviral doses restore intratumoral adenoviral expression to levels comparable to those of naive animals. However, the hepatic toxicity observed in preimmunized animals need to be further assessed due to the therapeutic implications for the treatment of cancer with multiple courses of adenoviral-mediated gene therapy.

Keywords: Adenovirus, Gene Therapy, Preimmunization, Toxicity, Pre-existing immunity.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor

ABSTRACT

Objective: Preimmunization to adenoviruses may influence the therapeutic effectiveness and toxicity of adenoviral-mediated gene therapy for cancer. This study was undertaken to evaluate the impact of intratumoral preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity.

Materials and Methods: The levels and duration of adenoviral (AdV) vector expression was evaluated in a subcutaneous mouse mammary cancer model of naive and preimmunized animals. BALB-C mice were injected subcutaneously with syngeneic TM40-D mouse mammary cancer cells (1×10^6 /50 μ l media). After 21 days of tumorigenesis, preimmunization was achieved by intratumoral injection of a gutless AdV vector (1×10^{11} v.p./tumor). Fourteen days later both naive and preimmunized groups of mice received an intratumoral injection of AdV bearing the luciferase reporter gene (AdV-Luc), at doses ranging from 2×10^9 to 2×10^{11} v.p./tumor. The levels of AdV-Luc expression in tumors and normal tissues as a function of time (days 2,7 and 14 after AdV-Luc injection) and AdV dose, were assessed with the Luciferase assay, and ELISA was used to quantitate AdV antibodies. Tissue histological changes and hepatic enzymes were used to evaluate normal tissue toxicity. Statistical analysis was conducted using Student's T -Test and Analysis of Variance.

Results: Preimmunization resulted in statistically significant lower luciferase expression in tumor (23-fold) and liver (800-fold). Preimmunized animals also demonstrated more pronounced decreases in liver luciferase expression by a minimum of 808-fold compared to tumor (minimum of 56-fold) at all time points. AdV antibody titers were higher in reimmunized animals at all time points and maximally increased one week after AdV-Luc injection in both groups. AdV dose related increases in intratumoral luciferase expression were observed only in preimmunized animals. Specifically, higher AdV doses, above 2×10^{10} v.p./tumor, increased intratumoral luciferase expression to levels comparable to those of naive animals. In liver, significant AdV dose related luciferase increase by 4000-fold was observed only for naive animals while preimmunization resulted in low levels of liver luciferase activity comparable to that of low dose naive group ($p > 0.424$). In contrast to naive animals, all preimmunized animals developed histologic evidence of grade 2-3 hepatic toxicity which was also reflected by increases in the average values of hepatic enzymes.

Conclusions: A preferential decrease in adenoviral vector expression is observed in liver compared to tumor after preimmunization. Higher adenoviral doses restore intratumoral adenoviral expression to levels comparable to those of naive animals. However, the hepatic toxicity observed in preimmunized animals need to be further assessed due to the therapeutic implications for the treatment of cancer with multiple courses of adenoviral-mediated gene therapy.

Keywords: Adenovirus, Gene Therapy, Preimmunization, Toxicity, Pre-existing immunity.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Dr. Estuardo Aguilar Córdoba

Asesor

Co-Asesor

1. INTRODUCCIÓN

Durante el último siglo se han observado dos importantes acontecimientos en la medicina: el primero de ellos consiste en una disminución de los índices de morbi-mortalidad de las enfermedades infecto-contagiosas y los padecimientos quirúrgicos a causa de la aparición de mejores antibióticos, el mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias, un mejor desarrollo tecnológico y del mejoramiento de las técnicas de asepsia. El segundo deriva de una sorprendente transición epidemiológica de la pirámide de población que ha ocasionado un incremento en el número de individuos pertenecientes a la tercera edad. La peculiaridad de estos acontecimientos ha provocado un significativo incremento en la prevalencia de los padecimientos genéticos, neoplásicos y crónico-degenerativos³⁵.

A pesar del incuestionable impacto sanitario y repercusiones económicas de las enfermedades genéticas, degenerativas y neoplásicas, su tratamiento es inadecuado y preponderantemente sintomático, por lo que su evolución es generalmente progresiva y el pronóstico, en un gran número de ellas, es irremisiblemente fatal. Desde esta perspectiva, resulta lógico comprender la creciente necesidad de experimentar con nuevos métodos terapéuticos y utilizar innovadoras herramientas tecnológicas que permitan erradicar, o al menos controlar, los devastadores efectos que este grupo de padecimientos ejercen sobre las poblaciones humanas.

1.1 LA TERAPIA GÉNICA: UNA INNOVADORA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

La terapia génica es una innovadora estrategia dirigida a transportar, transferir y expresar genes exógenos dentro de células de pacientes, con la finalidad de corregir principalmente defectos genotípicos y modificar sus alteraciones fenotípicas.

En términos generales, la introducción de los genes de interés se puede conseguir ya sea tratando a células extraídas del paciente (*ex-vivo*), que luego son regresadas a éste, o administrando el gen terapéutico directamente en las células de interés (*in-vivo*) Ver la **Figura. 1**

1.2 TERAPIA GÉNICA EX VIVO

Esta estrategia consiste en la obtención de células del paciente procedentes de un tejido u órgano de interés, las que se someten a disgregación, cultivo y preservación en condiciones de cultivo de tejidos. Ahí, las células son ulteriormente transfectadas o transducidas con el "gen terapéutico", utilizando para ello un vector adecuado. Luego, las células genéticamente modificadas son seleccionadas en función de su capacidad para expresar el gen exógeno de manera estable. Enseguida son propagadas y finalmente reimplantadas en el paciente. También es posible utilizar líneas celulares alogénicas en aquellos pacientes en los que por razones clínicas y/o funcionales, el órgano o tejido de interés no puede ser extraído con facilidad u ofrece dificultades para su cultivo o mantenimiento en condiciones *in vitro*.

1.3 TERAPIA GÉNICA IN VIVO

El tratamiento está basado en la administración local o sistemática del gen de interés. Aunque el ADN que constituye dicho gen puede ser administrado de forma directa, lo habitual es recurrir a la ayuda de algún vector que facilite la transferencia, entrada y localización intracelular del mismo. Así mismo, es posible recurrir a vectores que permiten la entrega selectiva del gen en un determinado órgano o tejido tumoral, sin requerir para ello de procedimientos traumáticos o quirúrgicos.

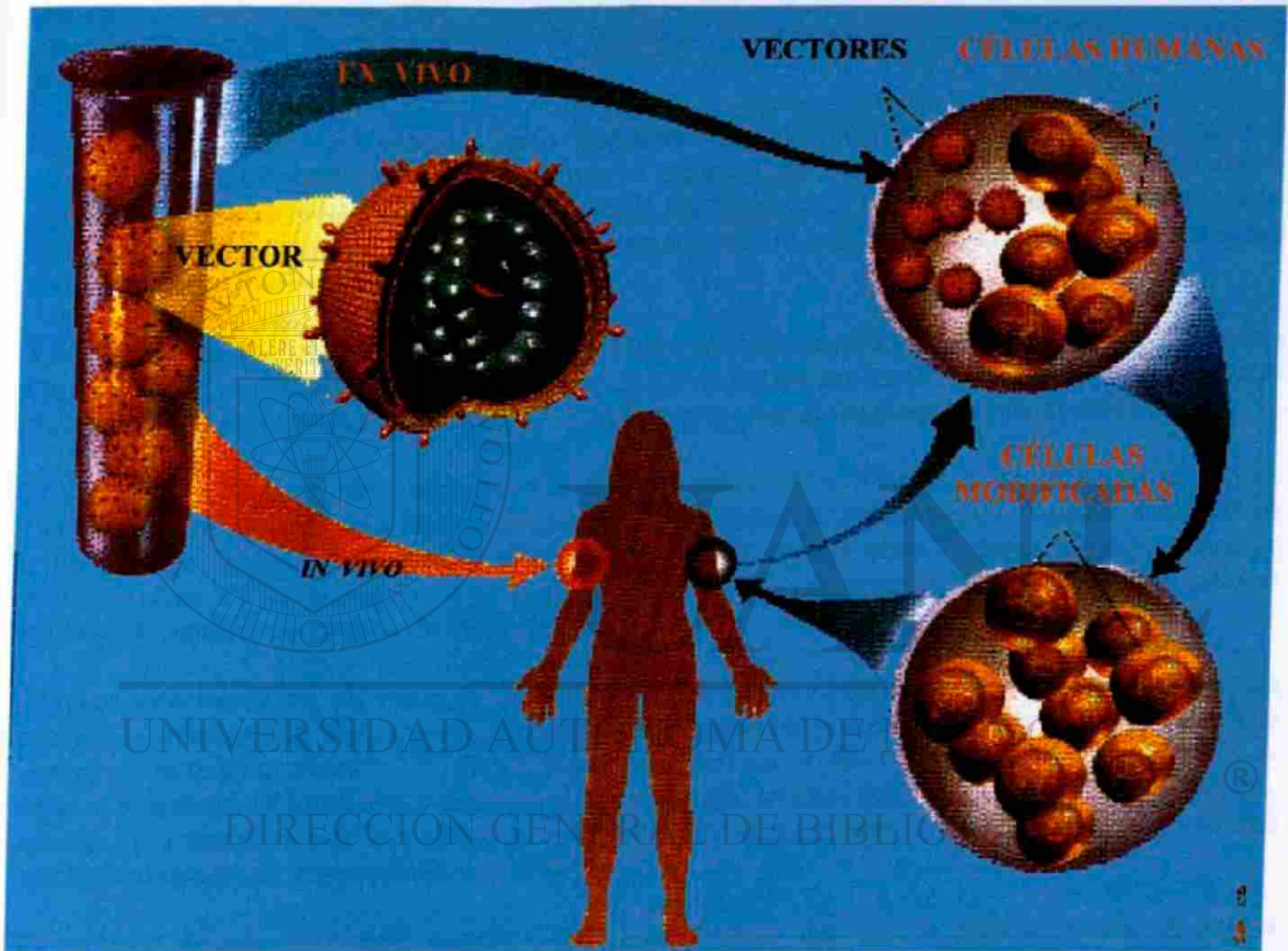


Figura 1. Terapia génica de células somáticas. En la terapia "ex vivo", se extraen algunas células del tejido afectado y se les inserta el nuevo gen sano, reinsertándolas posteriormente en el tejido del que se extrajeron. Allí se multiplican y expresan la nueva proteína funcional, corrigiendo el defecto. Mientras que en la terapia "in vivo", para introducir el gen sano es necesario utilizar los llamados vectores, que conducen en la mayoría de los casos a través del torrente sanguíneo, el material genético hasta las células afectadas. [Tomada de Friedmann Theodore (1997): Overcoming the obstacles to gene therapy: Scientific American: June; 80-85]

1.4 LOS PRIMEROS INTENTOS EN EL CAMPO DE LA TERAPIA GÉNICA.

El primer intento de tratar una genopatía en la especie humana se remonta al principio de la década de los 70s, cuando el Dr. Rogers Stanfield inoculó papiloma virus a tres hermanos afectados por una enfermedad autosómica recesiva conocida como argininemia⁶⁸. Los pacientes que sufren de este defecto congénito del metabolismo presentan diplejía espástica, convulsiones, hipotonía, hiperamonemia, irritabilidad y retraso mental profundo. El defecto metabólico deriva de un déficit enzimático en la actividad de la arginasa eritrocitaria y ocasiona un notorio incremento en la concentración de arginina en el plasma y líquido cefalorraquídeo. El fundamento de este innovador método de tratamiento deriva del conocimiento de que el virus del papiloma restablece los niveles de arginasa en células en cultivo deficientes en esta enzima⁶⁸.

La aventurada acción de inocular seres humanos con vectores virales, desencadenó debate y controversia en la comunidad científica. Como el proyecto fue realizado antes de la constitución de comités de bioética a nivel institucional, no se violó ley alguna y no se efectuaron acciones punitivas en contra del Dr. Rogers, ni del grupo de médicos alemanes que lo asistieron, a pesar de que el tratamiento fue infructuoso en varios intentos.

La benevolencia del hecho y la indulgencia de la opinión científica contemporánea, incitó al Dr. Martin Cline de la UCLA a intentar ser el primer investigador en utilizar las técnicas de DNA recombinante en el campo de la terapia génica. Sin embargo, el final de esta historia fue diametralmente opuesto.^{63, 73}

El Dr. Cline se desempeñaba como jefe del departamento de Hematología de la UCLA en el año de 1980, cuando intentó curar a dos pacientes Europeos afectados por talasemia. Su idea consistió en insertar un gen recombinante que codifica para una hemoglobina normal, dentro de las células de pacientes afectados por talasemia. A pesar de que el tratamiento no ocasionó efectos deletéreos, falló en mejorar las condiciones clínicas de los pacientes.

Algunos aspectos éticos, así como procedimientos de la práctica clínica, fueron violados durante este protocolo, levantándose un imponente torrente de comentarios y discusión pública sobre los usos y riesgos de la terapia génica^{63,74,75}. El comité para la defensa de los derechos humanos de la UCLA censuró el trabajo del Dr. Cline y ocasionó su renuncia a la jefatura del departamento de Hematología, además de la cancelación de dos subsidios a sus proyectos de investigación⁷². A pesar de esto, continuó con sus actividades de investigación dentro de la UCLA.

El corolario de este lamentable episodio, fue el surgimiento del axioma popular acerca de que la utilización de DNA recombinante en los seres humanos, debe ser controlada a través de un marco jurídico y/o Comités de Bioética y Bioseguridad que regulen su aplicación.

1.5 EL SURGIMIENTO DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL MANEJO DEL DNA RECOMBINANTE

En 1973 se efectuó una reunión científica en Asilomar, California, para discutir los riesgos inherentes a la utilización de DNA recombinante. El consenso de los participantes fue el mismo que el del axioma popular "es necesario vigilar y reglamentar los trabajos existentes en el campo de la tecnología del DNA recombinante"⁷¹.

En 1974 el NIH conjuntó a un Comité Consultor sobre el DNA Recombinante [Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)] y lo comisionó para formular una serie de leyes dirigidas a regular las investigaciones en ese nuevo campo. El resultado de ello, fue la publicación de una guía de normas y procedimientos para el uso de DNA Recombinante⁷¹.

El establecimiento de este marco normativo permitió institucionalizar los protocolos sobre terapia génica y diseñar nuevas técnicas de Biología Molecular. Asimismo, el desarrollo de diferentes estrategias con el uso de DNA recombinante se ha traducido en importantes avances en el campo de vectores virales y de genes suicidas, proporcionando a los profesionales de la biomedicina, importantes conocimientos que permiten utilizar estas singulares herramientas biológicas con fines terapéuticos.

1.6 REQUISITOS PARA INICIAR UN PROGRAMA DE TERAPIA GENICA

Cualquier prospecto de protocolo de terapia génica, deberá de llenar ciertos requisitos que garanticen su viabilidad, así como un beneficio incuestionable para el paciente. Entre las destrezas, herramientas y justificaciones que se tienen que cumplir, se encuentran las siguientes:

1. Es necesario contar con el gen normal, conocer su estructura y entender su regulación.
2. Es necesario contar con un método eficiente para introducir el gen terapéutico dentro de las células blanco. La versión defectuosa del gen (usualmente disfuncional) permanece inalterada en su locus correspondiente.
3. Es necesario contar con un método eficiente para construir y diseñar vectores virales (o no virales) que puedan transportar los genes terapéuticos a las células blanco (ncoplásticas), dentro del tejido u órgano afectado en el cual el gen normalmente funciona.
4. Es necesario contar con un método eficiente para introducir el vector -portador de un gen terapéutico- dentro de las células eucarióticas, y se debe garantizar su propagación en un elevado porcentaje de las células blanco, con la finalidad de que el procedimiento proporcione indudables beneficios terapéuticos.
5. La terapia génica debe de limitar su campo de aplicación a las células somáticas para evitar que los individuos tratados puedan segregar los transgenes a su descendencia. La terapia génica destinada a células germinales presenta innumerables objeciones y restricciones de carácter ético y debe esperar a que tales problemas se resuelvan dentro de las instancias encargadas de su normatividad y bioseguridad.
6. La terapia génica debe garantizar que los beneficios derivados de su aplicación sean considerablemente mayores que los riesgos o perjuicios producidos por su empleo. Por lo que el beneficio terapéutico debe de superar cualquier tipo de riesgo. El prototipo de riesgo es ejemplificado por la inserción al azar del DNA recombinante dentro de un cromosoma humano, lo cual puede ocasionar la activación de un proto-oncogen o la inactivación de un gen supresor de tumores involucrado con la regulación del ciclo de división celular o en la reparación del ADN. Bajo estas condiciones, la inserción mutacional puede desencadenar una cascada de efectos carcinogénicos. Esta es la explicación de por que los protocolos de terapia génica deben de ser aplicados en pacientes graves, o en estado terminal y preferencialmente intentar la cura de procesos neoplásicos o de enfermedades monogénicas de evolución progresiva y pronóstico irremisiblemente fatal.

7. Los protocolos de terapia génica deben de realizarse en células que puedan ser fácilmente aisladas del paciente, manipuladas *in vitro*, modificadas en condiciones de cultivo de tejidos y posteriormente reimplantadas dentro del paciente.

1.7 ESTRATEGIAS PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA

La función del DNA en la transferencia de características genéticas entre organismos procariotes fue demostrada por Avery, MacLeod y McCarty en 1944¹ y 18 años después Szalska⁷⁹ la demostró en células eucariotas. Luego Wigler⁸⁷ y cols. demostraron que el gen de la timidin cinasa procedente del virus del herpes simple exhibía la capacidad de transformar células de mamífero portadoras de la mutación TK⁻ en células TK⁺, las cuales podían ser identificadas utilizando un medio de selección HAT, llamado así por contener hipoxantina, aminopterina y timidina⁸⁶. Este procedimiento, consistente en introducir -por medios artificiales- DNA de origen exógeno dentro de células eucariotas, es conocido como **transfección**.

Aunque en los experimentos iniciales se demostró que era posible transfectar con ADN total extraído de una célula TK⁺, con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, la técnica se perfeccionó y se hizo posible introducir genes aislados.

Actualmente, existen un sinnúmero de técnicas que permiten introducir genes dentro de las células de mamífero. En términos generales podemos clasificar a éstas dentro de dos grandes categorías: En primer término, aquellas destinadas a lograr una expresión transitoria del gen de interés, y en segundo lugar, aquellas que permiten transformar a las células de una manera estable y prolongada⁵⁴.

En los sistemas de expresión transitoria, grandes cantidades de DNA recombinante entran en contacto con un reducido porcentaje de la población celular, para luego introducirse en el citoplasma de las células huésped. Esto garantiza una mayor eficiencia en la transferencia génica, así como altos niveles de expresión del transgen. Por lo que se obtendrá una mejor producción de la proteína de interés, aunque su tiempo de expresión sea limitado.

En los sistemas de transformación estable, solamente un pequeño porcentaje de las células pueden ser transfectadas o transducidas con DNA recombinante. Como el gen de interés generalmente se inserta dentro de los cromosomas de la célula, ésta continuará permanentemente transformada y transmitirá el DNA recombinante a su descendencia.

Los sistemas de transformación estable deben garantizar que la secuencia de interés se integre dentro de los cromosomas de la célula o que el DNA recombinante tenga la capacidad de duplicarse de manera autónoma y eficiente. De tal forma, que el gen extraño o transgen no se pierda durante los ciclos posteriores de la división celular⁵³.

Algunos vectores (como los adenovirus) están particularmente diseñados para producir una transformación celular transitoria, mientras que otros vectores virales son más apropiados para garantizar una transformación permanente de las células. Un ejemplo de esto último son los retrovirus.

Basado en la utilización de vectores virales, es posible identificar cinco componentes esenciales que conforman un protocolo de terapia génica:

1. Elección de la enfermedad apropiada.
2. Conocimiento de las bases moleculares del defecto involucrado.
3. Clonación de la contraparte funcional del gen causante de la enfermedad.
4. Regulación correcta y suficiente de la expresión del gen de interés y
5. Procedimiento para introducir el gen terapéutico al interior de las células blanco (neoplásicas).

Adicionalmente, es conveniente conocer las características biológicas del vector que se pretende utilizar, la patogénesis de la enfermedad y contar con un modelo animal o de cultivo de tejidos para validar la estrategia terapéutica que se utilizará.

1.8 DEFINICION DE VECTOR

Los vectores son herramientas biológicas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que éste pueda funcionar correctamente¹⁶. Los vectores pueden clasificarse en: vectores virales y vectores no virales. A causa de que los vectores no virales se encuentran al margen de los objetivos de esta tesis, sólo describiremos algunas de las características más importantes de los vectores virales.

1.9 RETROVIRUS COMO VECTORES EN TERAPIA GÉNICA

En el transcurso de los últimos años se ha observado un desarrollo explosivo en el campo del diseño y construcción de vectores virales. Cada diseño tiene como finalidad mejorar las aplicaciones terapéuticas de estrategias precedentes, así como hacer más simple y económica la construcción del vector viral. Los retrovirus presentan la ventaja de ser los vectores biológicos más exhaustivamente estudiados hasta la fecha.

El genoma de los retrovirus está constituido por una sola cadena de RNA, la cual se duplica a través de la formación de una molécula de DNA bicatenario, como un paso intermedio y dependiente de la transcriptasa reversa. El ciclo de vida de los retrovirus depende de una etapa intracelular en la cual el DNA viral de doble cadena se inserta al azar en el genoma de la célula huésped

El genoma retroviral está constituido por tres genes primordiales, *gag*, *env* y *pol*, los cuales son expresados en poliproteínas. Las secuencias *gag* y *env* se relacionan con el empaquetamiento y generación del virión. El gen *gag* codifica para una "poliproteína" que es seccionada en 3 o 4 proteínas destinadas a formar la cubierta interior del virus. La proteasa que cataliza este recorte forma parte de la propia poliproteína en muchas clases de retrovirus; puede ser parte de *gag* o de *pol*, o en algunas ocasiones se encuentra como un marco de lectura independiente⁴⁵. El gen *env* codifica para los componentes de la corteza o revestimiento de la partícula viral. La secuencia de *pol* está vinculada con los procesos de recombinación y síntesis de ácidos nucleicos. El gen *pol* codifica para la enzima transcriptasa reversa, la cual está constituida por dos subunidades, a y b; el gen *pol* codifica para la subunidad b, mientras que la subunidad a es un fragmento formado a partir de la proteólisis de la subunidad b. El producto del gen *pol* es también una poliproteína que dará lugar a la transcriptasa reversa y a una integrasa necesaria para la inserción del DNA viral dentro de los cromosomas de la célula huésped⁵⁵. Ver la Figura 2.

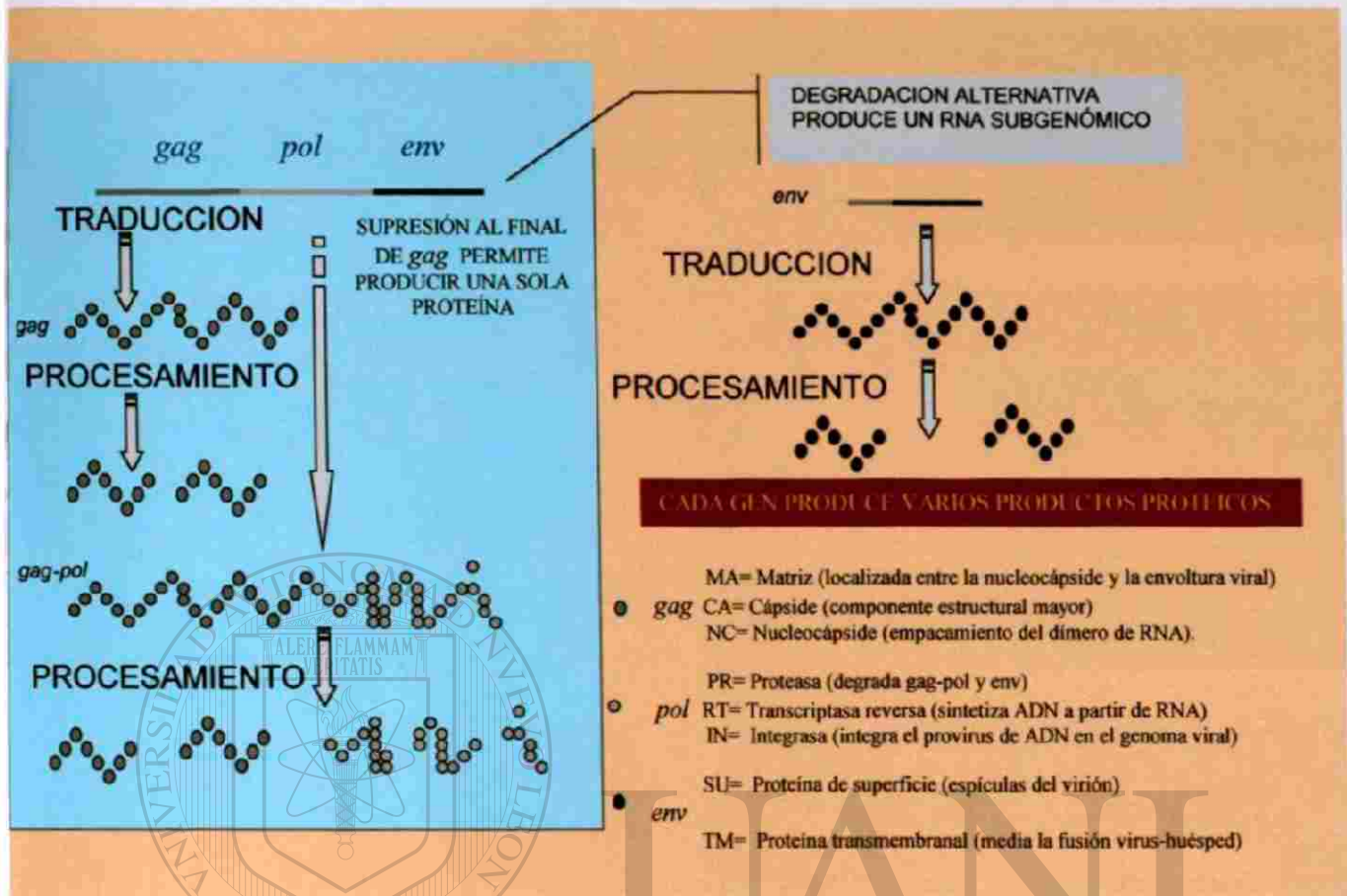


Figura 2. Genoma retroviral. Los genes del retrovirus son expresados como poliproteínas que luego son procesadas en productos proteicos individuales. [Modificado de Lewin Benjamin (2000): Genes VII, Oxford Univ. Press, 488]

La enzima transcriptasa reversa cataliza tres diferentes reacciones: primero, la síntesis de DNA a partir de RNA; segundo, la degradación de RNA a través de su actividad de RNAsa, y tercero, la síntesis de DNA a partir de DNA. La enzima requiere de un cebador para iniciar la síntesis de DNA. El cebador es una molécula de tRNA incluido dentro de la partícula viral y obtenido durante una infección previa. La molécula de DNA (de cadena simple) transcrita a partir del genoma de RNA original, es más larga que la matriz de RNA que le dió origen, ya que la enzima transcriptasa reversa realiza un intercambio de transcritos al copiar la secuencia 3' del RNA en el extremo 5' del DNA y copiar la secuencia 5' del RNA en el extremo 3' del DNA. La particularidad de este fenómeno dará origen a los característicos LTRs (Long Terminal Repeats) en ambos extremos del DNA. Las secuencias LTRs son indispensables para la integración del genoma viral. El DNA lineal bicatenario es ulteriormente insertado por medio de la integrasa en los cromosomas de la célula huésped. La transcripción del DNA integrado a partir de un promotor en el LTR izquierdo generará las futuras copias de la secuencia de RNA del genoma retroviral³⁸. Ver la **Figura. 3**

Los retrovirus han desarrollado el método biológico más eficiente para introducir genes foráneos al interior de las células animales, siendo por ello ideales para derivar vectores para terapia génica. Los virus han desarrollado refinados sistemas de infección celular que inician con la unión de la partícula viral a receptores específicos de membrana celular, continúan con la liberación y/o expresión de su genoma dentro del citosol, y culminan con la inserción de su genoma (en el caso de retrovirus) dentro de los cromosomas de la célula huésped.

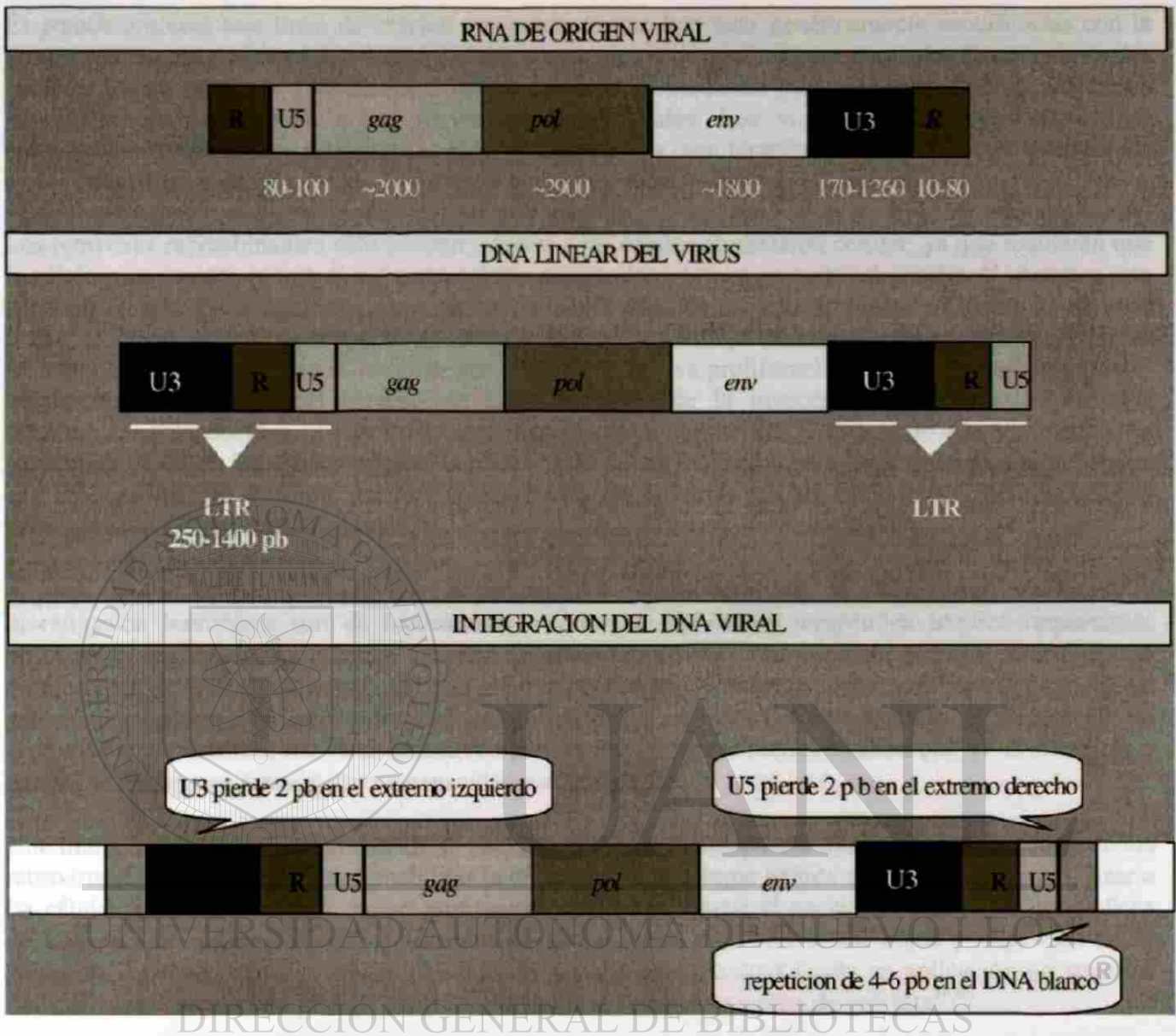


Figura 3. Mecanismo de integración de retrovirus. El RNA del retrovirus termina en repeticiones de 10 a 80 nucleótidos (R). Mientras que el DNA lineal termina en LTR_s y el provirus termina en LTR_s que han sido recortados en dos pares de bases. [Modificado de Lewin Benjamin (2000): Genes VII. Oxford University Press. 489.]

El procedimiento general para la construcción de un vector retroviral recombinante consiste en: eliminar y sustituir los genes *gag*, *pol* y *env* para producir un vector viral defectivo en su replicación, el cual requiere de una complementación de sus funciones virales *en trans* (proporcionados por un genoma viral diferente al del vector en cuestión). Las secuencias virales que necesariamente deben conservarse dentro del vector son: los extremos LTRs indispensables para la integración, los sitios adyacentes para enlace con el cebador, y las señales para empacamiento³⁸.

Es común emplear una línea de células empacadoras que han sido genéticamente modificadas con la integración de un genoma retroviral defectivo pero capaces de producir, *en trans*, las funciones virales faltantes²⁹. Este segundo genoma viral carece de la señal necesaria para el empacamiento, quedando inhabilitado para integrarse a las nuevas partículas virales. Los virus secretados por las células empacadoras normalmente contienen la secuencia de interés (gen terapéutico), lista para ser incorporada en los cromosomas de las células del paciente con un elevado margen de eficiencia.

Los retrovirus recombinantes sólo pueden infectar a las células en división celular, ya que requieren que la célula experimente la fase S del ciclo celular para poder integrar su material genético²⁵. Aunque este hecho es en apariencia una desventaja, ya que la mayor parte de los tejidos vitales presentan un elevado índice mitótico, el fenómeno puede transfigurarse en una ventaja cuando el tumor canceroso que se pretende erradicar se encuentra rodeado por tejidos con escasa proliferación celular. Por ejemplo, en el tratamiento de gliomas del cerebro de ratas, a través de la inyección de fibroblastos murinos establemente transducidos con un vector retroviral portador del gen HSV/tk, aunado a la administración simultánea de GCV. La técnica explota la incapacidad de los retrovirus para transferir genes a las células que no experimentan división, por lo que selectivamente el vector actuará sobre las células tumorales y respetará a las células normales del SNC¹³.

A pesar de que los beneficios, y nuevas perspectivas inherentes al uso de vectores retrovirales en la investigación biomédica son de incuestionable valor, su aplicación terapéutica implica importantes problemas. Algunos virus pueden insertar su material genético de manera azarosa dentro de los cromosomas de la célula huésped. De esta manera pueden producir mutaciones por inserción e inactivar genes relacionados con el control de la proliferación celular, desencadenando el fenómeno de carcinogénesis. Además, los virus defectivos pueden experimentar recombinación con virus silvestres o retrovirus endógenos y readquirir su capacidad patogénica.^{50,51}

Una limitación adicional surge cuando el paciente produce una respuesta inmunológica en contra de los retrovirus. Esta respuesta puede inhabilitar la eficiencia de la terapia génica al destruir al vector o lisar a las células infectadas antes de que el gen terapéutico pueda ayudar al paciente. Finalmente, los índices de transducción, expresión y diseminación de los vectores retrovirales son bajos y dependen de la presencia de una población celular rápidamente proliferativa, lo cual limita su aplicación en aquellos tipos de cáncer con escasa proliferación celular, como el adenocarcinoma de próstata^{58,62}.

1.10 ADENOVIRUS COMO VECTORES RECOMBINANTES EN PROTOCOLOS DE TERAPIA GÉNICA.

Los vectores adenovirales, en comparación con los retrovirus, presentan un conjunto de ventajas e inconvenientes. Las ventajas derivan de la ubicuidad y bioseguridad de los adenovirus humanos. Las formas silvestres ocasionan un cuadro moderado de faringitis en personas sanas. Los virus tienen especial afinidad por las células epiteliales, a las que se unen por medio de receptores de membrana específicos. Además, la expresión de su material genético no depende de la división celular de la célula huésped. Finalmente, los adenovirus infectan con facilidad a las células humanas, produciendo niveles elevados de la proteína terapéutica durante las etapas iniciales de la infección.

Después de la internalización de las partículas virales, su ADN es exportado hacia el núcleo, pero no se inserta en los cromosomas^{30,31}. Consecuentemente, existe muy poco riesgo de secuelas derivadas de la infección con adenovirus. Esta observación elimina la posibilidad de segregación mendeliana en células germinales y el riesgo de mutagénesis insercional,^{22,91} características ambas indeseables de los retrovirus.

Adenoviridae es una familia de virus patógenos de vertebrados. Sus viriones contienen ADN bicatenario, son de simetría cúbica, carecen de envoltura y presentan espículas (pentones). Los adenovirus son icosaedros de 65 a 80 nanómetros de diámetro, su genoma tiene una longitud de 36,000 nucleótidos y contiene 13% de ADN y 87% de proteínas. Fueron aislados por primera vez en 1953 por Rowe⁶⁹, a partir de las amígdalas o tejido adenoidal proveniente de niños con infecciones faríngeas. Se clasifican en 6 subgéneros (A,B,C,D,E y F) y se han descrito más de 42 serotipos con capacidad de provocar infecciones en el hombre.

Los tipos 2 (Ad2) y 5 (Ad5) han sido extensamente estudiados, y son por lo tanto ampliamente utilizados en el diseño de vectores virales para terapia génica^{27,37}. Aunque, existen algunos reportes que describen su capacidad de generar tumores en animales, no se ha descrito su asociación con tumores en los seres humanos.

La infección por Ad5 se traduce en una infección aguda de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, ojos, glándulas y nódulos linfáticos, siendo el cuadro clínico leve y muy similar al del resfriado común. Como la exposición a adenovirus se encuentra ampliamente difundida entre la población, la mayor parte de la población de adultos son seropositivos para este tipo de virus.

En su forma natural se les encuentra en el núcleo de las células infectadas, como estructuras circulares normalmente cerradas, a causa de la interacción con proteínas covalentemente unidas a cada uno de los extremos 5' del genoma viral. El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular que permiten clonar DNA circular de origen viral, facilita enormemente el poder manipular esos genomas, para lograr producir vectores virales defectivos en su duplicación⁵⁶.

Los mecanismos de expresión génica se realizan en dos importantes etapas, usualmente conocidas como fase temprana y fase tardía (Graham, 1991, Horwitz, 1991). Desde un punto de vista muy general se puede afirmar que las proteínas formadas durante la fase temprana son de naturaleza regulatoria, mientras que las que se expresan tardíamente están relacionadas con los componentes estructurales del virión.

Se han identificado seis regiones de expresión temprana (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4), aunque otras regiones diferentes a éstas también han sido asociadas con expresión inmediata después de la infección (L1, IVa2 y IX). Las regiones E1A y E1B son indispensables para la duplicación del virus y se han vinculado con la capacidad oncogénica de los adenovirus *in vitro*. La región E2A codifica para una proteína que se une al DNA y E2B codifica para una DNA polimerasa y para la proteína que se une a los extremos 5' del genoma viral. Aunque E3 no es necesaria para la duplicación viral *in vitro*, sí se encuentra asociada con el mecanismo que permite al virus evadir los sistemas de defensa inmunológica del huésped. Finalmente, la proteína E4 es responsable del ensamblaje de partículas virales.

La producción de vectores adenovirales con incompetencia para duplicarse es un elemento clave de su bioseguridad y se complementa con dos aspectos. El primero, consiste en la condición de depender de la producción de proteínas regulatorias en "trans" (fuera del genoma viral) y el segundo, se relaciona con la incapacidad de la cápside para contener (empacar) más del 105% del genoma total del virión. Para resolver la primera condición, es necesario contar con una línea celular "ayudadora", correspondiendo en este caso a células transformadas de riñón fetal de la línea 293, las cuales han sido transfectadas con secuencias genómicas de origen adenoviral derivadas del extremo izquierdo (0-11 unidades) del mapa génico y que contienen la región E1A del genoma viral, de tal forma que complementan en trans la propagación del Adv-recombinante (Graham, 1997)²⁶. Esta línea celular permite producir virus incompetentes para la duplicación -defectivos en E1-.

El desarrollo de una estrategia de producción de vectores virales se basa en el conocimiento de que el DNA viral se torna circular dentro de las células infectadas, por lo que este fenómeno puede ser explotado para producir genomas-Adv circulares infecciosos, que pueden ser posteriormente propagados como plásmidos bacterianos. El uso de plásmidos durante el proceso de producción y propagación de Adv-recombinantes es hoy ampliamente difundido debido a que se disminuyen grandemente las posibilidades de regeneración de adenovirus competentes en su replicación, debido a que el genoma plasmídico es usualmente 3 o 7 kb más grande que el del genoma viral, y no podrá ser empacado dentro de la cápside viral. Por lo tanto, es posible construir genomas virales auxiliares con insertos de DNA de relleno. Estas construcciones con genoma redundante, exceden la capacidad máxima de empacamiento de la cápside viral e impiden el proceso de ensamblaje de los viriones (Bett, 1993-94)^{4,5}, pero pueden ser utilizadas en procesos de co-transfección con plásmidos portadores del gen terapéutico, para así lograr la producción de un vector terapéutico a través de un mecanismo de recombinación.

Debido a que los viriones pueden empacar hasta un 105% de la longitud del genoma de un adenovirus silvestre, después de producir una delección de 2.9 kb dentro de la región E1, es posible obtener construcciones de vectores deficientes en su duplicación con insertos de hasta 4.7-4.9 kb. El genoma adenoviral es demasiado largo para ser convenientemente manipulado, sin correr el riesgo de seccionar la molécula de ADN durante el procedimiento de clonación o inserción del gen terapéutico de interés. Para salvar este inconveniente, el gen de interés es insertado dentro del extremo izquierdo del genoma viral, usualmente por medio de delecciones compensatorias en la región E1. La región E1 no es necesaria para la duplicación viral dentro de las células 293, ya que estas expresan el 11% del extremo izquierdo del genoma-Adv5. Para garantizar la viabilidad de los viriones, la delección no debe de incluir las secuencias de repetición terminal invertidas ni la señal de empacamiento. Como paso final, la construcción es posteriormente ligada a un plásmido recombinante²⁷.

El genoma redundante -virus auxiliar- y el genoma plasmídico portador del gen de interés son co-transfectados en las células 293. El tamaño del gen de interés más la longitud del genoma viral defectivo no deben de exceder las limitaciones de tamaño para el empaquetamiento. De tal forma, que el virus será producido solamente cuando ocurran fenómenos de recombinación genética entre los dos plásmidos, y el gen de interés reemplace al ADN de relleno, produciéndose un ADN recombinante lo suficientemente largo para ser empacado dentro de la cápside del virión^{28,29}. Ver la Figura 4.

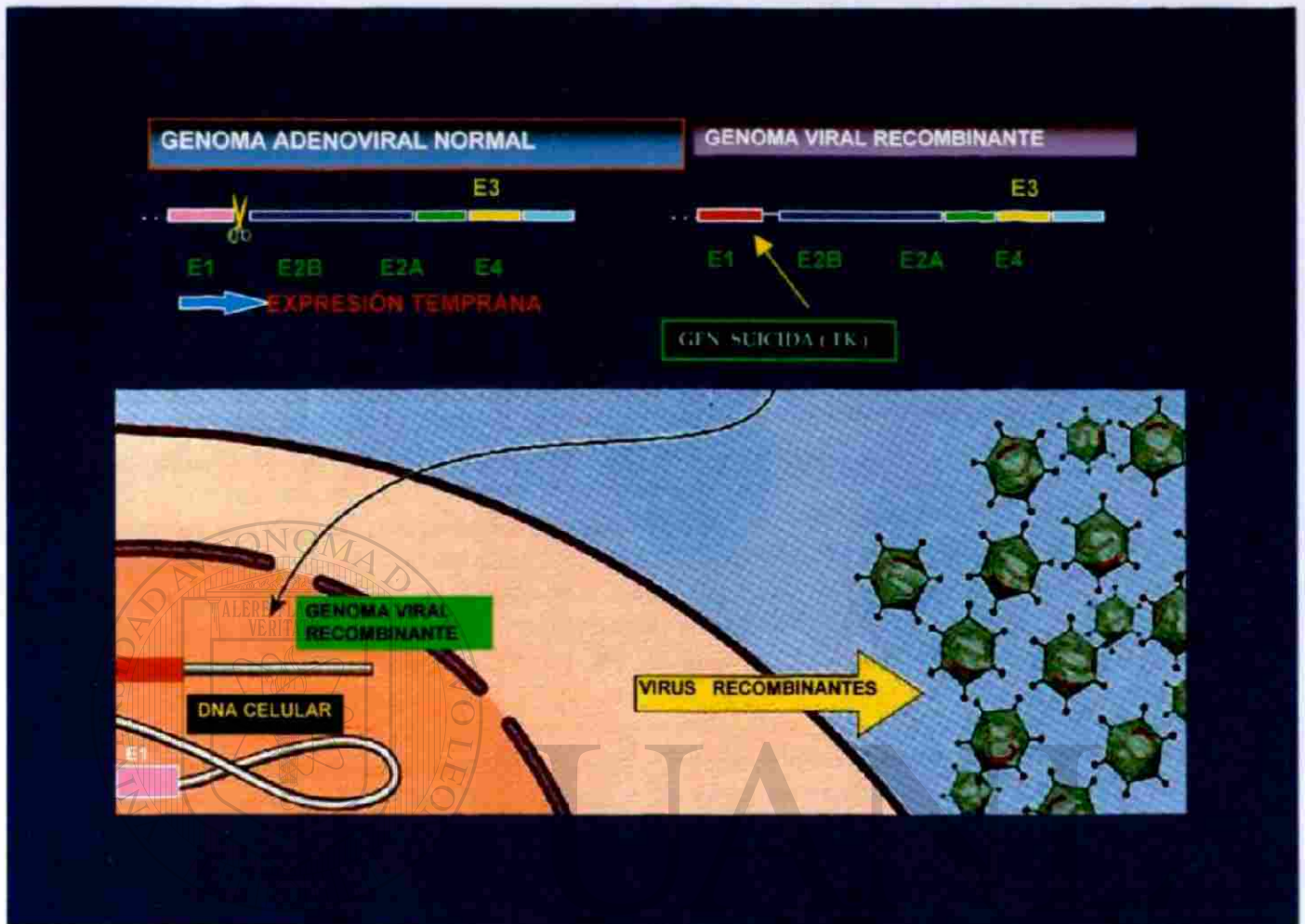


Figura 4. Fabricación de adenovirus recombinantes. Muestra como el transgen es insertado dentro del genoma adenoviral con la región E1 amputada. Sin la región E1 el virus se torna deficiente en su duplicación. Con la finalidad de producir grandes cantidades de virus recombinantes para fines terapéuticos, se pueden utilizar células empacadoras que aportan las proteínas codificadas en la región E1. [Modificado de Douglas Joanne T y Curiel David T (1977): Adenoviruses as vectors for gene therapy: Science and Medicine: March/April, 44-53.]

1.11 VENTAJAS DE LOS VECTORES ADENOVIRALES EN TERAPIA GÉNICA

La bioseguridad de adenovirus en terapia génica ha sido corroborada en el tratamiento del cáncer de próstata, hígado, ovario, vejiga y pulmón. Así como en el tratamiento de algunas enfermedades monogénicas como la fibrosis quística, en la falta de la enzima ornitín-transcarbamilasa y en la deficiencia del factor IX^{8,77,90}. Recientemente, se ha demostrado la eficacia terapéutica y la seguridad de adenovirus transportadores del gen (supresor del crecimiento tumoral) **p53** en el tratamiento del cáncer pulmonar en ratones desnudos atímicos⁶⁴.

Los adenovirus son estables en el torrente sanguíneo. Esta observación permite su inoculación sistémica (endovenosa) en protocolos de terapia génica. Sin embargo, los adenovirus son inmunogénicos y los pacientes desarrollan una respuesta inmune en contra del vector, limitando de esta manera la expresión del gen terapéutico e imposibilitando administraciones subsecuentes del vector. Como el DNA viral eventualmente desaparece, el tratamiento de enfermedades crónicas y de tumores de evolución lenta requiere de la inoculación repetida del vector, lo que constituye una desventaja de los vectores adenovirales.

Esta situación desventajosa, puede en algunas condiciones transformarse en una prerrogativa, por ejemplo, cuando es necesario expresar temporalmente una proteína para inducir una respuesta inmune o una respuesta suicida en contra de algunos tipos de cáncer. En efecto, la administración de un solo ciclo de tratamiento a base de la inyección intratumoral de un vector adenoviral portador del gen HSV/tk, junto con la administración simultánea de ganciclovir, se ha traducido en una importante remisión del crecimiento tumoral en pacientes con carcinoma de próstata focalizado³⁴.

Adicionalmente, los vectores adenovirales pueden suprimir al tumor a través de un efecto oncolítico directo, ocasionado por la replicación viral. Este efecto incrementa la respuesta inmune del huésped en contra de los antígenos tumorales. Desde esta perspectiva, los adenovirus pueden ser útiles como vacunas tumorales o para expresar genes relacionados con los antígenos de superficie de Hepatitis B, ya que ellos pueden duplicarse en células Vero y WI-38, las cuales están acreditadas para producción de vacunas⁹.

En resumen, las ventajas relacionadas con el uso de vectores adenovirales se fundamentan en el hecho de que son relativamente fáciles de estudiar, pueden ser alterados genéticamente, y tienen una tendencia natural de adherirse a tipos específicos de células y de transferir su ADN a las mismas. Algunas de las ventajas más importantes son enlistadas a continuación:

- a. Los vectores adenovirales pueden ser preparados, purificados y concentrados fácilmente y pueden alojar genes de gran tamaño.
- b. Admiten hasta casi 36 Kb. de ADN foráneo (ya que se puede eliminar casi todo el material genético involucrado en la replicación viral).
- c. En su producción se obtienen títulos altos de adenovirus recombinantes purificados.
- d. Aunque introducen genes en el núcleo, no ocasionan mutagénesis insercional.
- e. Son fácilmente manipulables *in vitro*.
- f. Son eficientes para transferir genes suicidas *in vivo*.
- g. Infectan células que no están en división celular.
- h. La infección causa síntomas benignos.
- i. La infección presenta ubicuidad tisular.

1.12 PRINCIPALES INCONVENIENTES DE LOS VECTORES ADENOVIRALES.

La presente generación de vectores adenovirales presenta cuatro importantes limitaciones: *i*). primero, los adenovirus son inmunogénicos, por lo que los seres humanos son portadores de anticuerpos preformados en contra del vector. Durante el inicio del tratamiento pueden expresar cantidades importantes de la proteína deseada, pero la inmunidad humoral del huésped rápidamente suprime la expresión del gen terapéutico.

ii). Segundo, carecen de especificidad para células blanco, lo cual hace imposible transportar genes (por inyección endovenosa) a tejidos específicos con propósitos terapéuticos. *iii*). Tercero, son muy pequeños y no pueden acomodar secuencias largas dentro de su genoma.

iv). Finalmente, aunque se ha reportado que los adenovirus no provocan efectos adversos¹² Postlethwaite¹⁷ en 1973 y Duncan¹⁷ en 1978, refieren alteraciones hepáticas en ratones que recibieron una inyección intravenosa de adenovirus humanos tipo 5.

1.13 LA TERAPIA GÉNICA DE LOS TRASTORNOS GENÉTICOS.

Los avances en terapia génica de las enfermedades hereditarias en su conjunto, son considerados inadecuados. Además, los experimentos en este campo están sometidos a estrictas regulaciones prácticas y a severas medidas de bioseguridad y ética, por lo que se han visto restringidos al estudio y tratamiento de trastornos mendelianos graves o de pronóstico fatal. Por otro lado, las investigaciones están circunscritas a las células somáticas, para garantizar que las modificaciones genéticas no puedan ser transmitidas a la progenie.

Históricamente, las enfermedades monogénicas han sido tratadas suprimiendo los efectos biológicos o funcionales de las mutaciones génicas, pero excepcionalmente es posible corregir el defecto molecular que las origina. Desafortunadamente, la manipulación o intervenciones no genéticas (sintomáticas) son usualmente paliativas e insólitamente curativas. Ante este desalentador panorama, las diferentes estrategias de terapia génica ofrecen una razonable oportunidad para recuperar la salud en aquellos individuos que sufren los efectos de alguna enfermedad monogénica^{40,41,49}.

Entre las enfermedades genéticas que han sido estudiadas con este propósito se encuentran el síndrome de inmunodeficiencia secundaria a deficiencia de adenosin deaminasa (ADA). Los pacientes con deficiencia de ADA mueren en etapas tempranas de la vida a causa de infecciones intercurrentes, ya que sus linfocitos T y B no se desarrollan correctamente.

La carencia de ADA ocasiona una significativa elevación en los niveles de dATP, el incremento del cual provoca por retroinhibición una deficiencia general en los niveles de otros dNTPs, lo cual provoca citotoxicidad en los linfocitos T, ya que la deoxiadenosina es particularmente tóxica para las células T pero no para los linfocitos B⁵⁷. Aunque existe tratamiento sintomático en forma de administración de antibióticos, inmunoglobulinas y trasplante de médula ósea, los pacientes con deficiencia de ADA no sobreviven y permanecen confinados a una "burbuja estéril".

Precisamente, el primer intento exitoso de terapia génica fue iniciado en 1990 en una niña de 4 años de edad afectada con deficiencia de ADA. Las células de la paciente fueron sometidas a leucoféresis y las células mononucleares fueron aisladas y cultivadas bajo condiciones que estimulaban la activación y el crecimiento de los linfocitos T. Posteriormente, los linfocitos fueron incubados en presencia de un vector retroviral recombinante portador del gen normal de la ADA, así como de un marcador de selección (gen de resistencia a la neomicina). Finalmente, los linfocitos modificados fueron introducidos al torrente circulatorio de la paciente. Un segundo paciente fue sometido al mismo tratamiento en 1991. Los resultados obtenidos en ambos pacientes demostraron una notoria mejoría de sus condiciones clínicas y en sus funciones inmunológicas (Culver & Anderson, 1991)¹⁴.

Recientemente, se han efectuado protocolos de terapia génica en pacientes con fibrosis quística⁸⁵ y deficiencia del factor IX. Las estrategias de terapia génica dirigidas a introducir una versión funcional del gen que debería producir un producto denominado regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística o CFTR, han demostrado que la terapia génica de estas enfermedades es efectiva, segura y presenta pocos efectos colaterales (Zielenski, 1995)⁹².

1.14 LA TERAPIA GÉNICA SUICIDA

El tratamiento de un gran número de procesos neoplásicos se fundamenta en el uso de agentes quimioterápicos con una elevada capacidad para aniquilar a las células cancerosas. Sin embargo, la utilidad de tales esquemas terapéuticos se ve limitada por su carencia de selectividad y su consecuente toxicidad celular sobre tejidos normales. Un prometedor abordaje para incrementar la selectividad tisular de los agentes antineoplásicos, consiste en el uso de "genes suicidas", los cuales son genes que originan la conversión de un droga inactiva ("prodroga") en un agente quimioterápico farmacológicamente activo. La estrategia consiste en asegurar la presencia y expresión de genes suicidas en tantas células cancerosas como sea posible, mientras se limita su expresión en las células de los tejidos normales^{83, 95}.

Con el descubrimiento de genes que selectivamente se expresan en las células de tejidos específicos, se ha desarrollado una nueva avenida de investigación que permitirá en corto tiempo, etiquetar genes terapéuticos para que se transcriban de manera selectiva dentro del núcleo de las células de ciertos tejidos. Estos genes de expresión tisular-específica, han sido identificados recientemente, y representan nuevos oncogenes, receptores de superficie celular, genes supresores de tumor, así como promotores de enzimas, antígenos y hormonas, entre otros³⁶.

Recientemente, Braiden (1998)⁶ reportó un innovador abordaje para el tratamiento del cáncer de tiroides. La estrategia consiste en la construcción de un vector retroviral portador del gen HSV/tk, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor de la tiroglobulina (TG). Sus resultados demuestran que este vector recombinante etiquetado con el promotor-TG, confiere sensibilidad al GCV a todas las células tiroideas que expresan TG. Este modelo de terapia génica suicida, puede ser aplicable en el tratamiento selectivo de carcinomas de tiroides que expresan TG.

Desde esta misma perspectiva, se ha caracterizado una secuencia promotora altamente eficiente para el gen del antígeno prostático seroespecífico (APSE). La expresión de este promotor es dependiente de andrógenos y exclusiva del tejido prostático. En breve tiempo se iniciarán protocolos de investigación en fase I consistentes en ligar esta secuencia promotora con diferentes genes suicidas (HSV-tk, citosin-deaminasa etc.), en un intento de lograr una expresión selectiva y limitada al microambiente de la próstata⁸.

Existe también la posibilidad de enlazar estas secuencias rotulantes con genes que codifican para proteínas citotóxicas, como el de la toxina diftérica y el del factor de necrosis tumoral, cuya capacidad de matar células es sumamente efectiva, lo cual limita su administración de forma sistémica. La expresión selectiva de este grupo de genes, puede transformarlos en valiosos instrumentos para iniciar nuevas estrategias de terapia génica suicida.

Alternativamente, Herman y Aguilar han sostenido que se pueden administrar genes suicidas no etiquetados, de manera directa dentro del parénquima prostático. La inyección directa sin la ayuda de un promotor de selectividad como el del APSE, puede en teoría garantizar altos niveles de expresión dentro de tumores de próstata. A este respecto, estos investigadores han reportado disminución de los niveles del APSE, así como ausencia de toxicidad sistémica después de la inoculación intratumoral directa de un vector adenoviral portador del gen timidín-quinasa del virus Herpes Simple (HSV-tk)⁵⁴, seguida por la administración de ganciclovir, cuyo mecanismo de acción se ilustra en la figura 5.

Por otro lado, en el Laboratorio de Vectores Virales del Baylor College of Medicine de Houston Texas y en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L se ha utilizado el virus Herpes Simple portador del gen de la timidín quinasa (*HSV-tk*), -el cual codifica para una enzima destinada a activar por fosforilación un agente farmacológico conocido como Ganciclovir (*GCV*) - para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma de próstata^{18, 69}. Puesto que las células de mamífero no poseen la capacidad de monofosforilar al *GCV*, la citotoxicidad de este fármaco quedará vinculada y dependiente de una exitosa introducción del vector adenoviral y de la subsecuente expresión del gen *HSV-tk* que permite activar al *GCV*.

Las células del paciente que no se encuentran en proliferación celular activa pueden expresar el gen *HSV-tk* y por añadidura fosforilar al *GCV*. Sin embargo, este fenómeno no representa peligro para el paciente, ya que las células que no experimentan mitosis no sintetizan DNA y por ende no utilizan el *GCV* fosforilado. Por lo tanto, el riesgo es considerablemente menor al derivado de la utilización de otros quimioterápicos con elevada capacidad citotóxica y usualmente utilizados dentro de los esquemas terapéuticos de la mayoría de los Departamentos de Oncología.

Este novedoso enfoque terapéutico está particularmente diseñado para ser aplicado en pacientes con procesos neoplásicos caracterizados por un alto grado de malignidad, secundaria a su elevada proliferación celular y capacidad de formar metástasis. Una segunda condición para seleccionar al paciente sometido a tratamiento, es que el tumor se encuentre adyacente a tejidos u órganos constituidos por células con escasa proliferación celular. Ver la **Figura 5**.

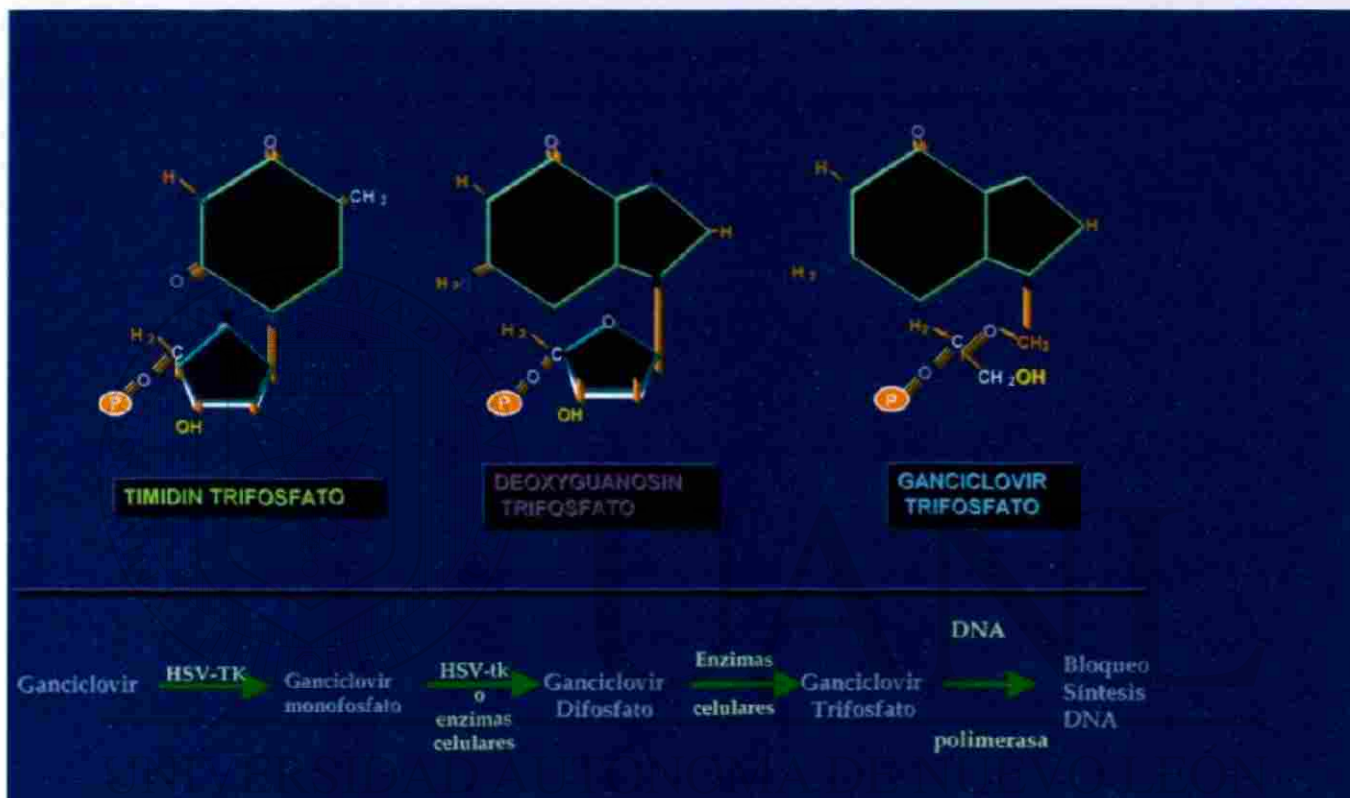


Figura 5. Mecanismo de acción del ganciclovir. El ganciclovir, cuya forma activa es el GCV trifosfato, no es fosforilado inicialmente a su forma monofosfatada por las quinasas celulares. Este paso requiere de la participación de la enzima timidin quinasa de origen viral (*HSV-tk*). Posteriormente, el GCV-monofosfato es fosforilado hasta su forma trifosfatada por las quinasas celulares. La fosforilación de este análogo de nucleósido lo transforma en un intermediario que posteriormente es incorporado en las cadenas de DNA durante el proceso de división celular, bloqueando a la DNA polimerasa y suprimiendo el proceso de duplicación del material genético celular, ocasionando la muerte de la célula afectada.

1.15 TERAPIA GÉNICA PROFILÁCTICA (Genoprofilaxis)

Esta singular estrategia consiste en utilizar genes suicidas como terapéutica preventiva de los trastornos neoplásicos. La terapia génica preventiva explota la etiología clonal de las neoplasias y permite introducir genes suicidas en individuos sanos o en individuos con predisposición genética al cáncer (portadores de oncogenes), o en pacientes con lesiones pre-malignas (displasias, poliposis), con la esperanza de incrementar las probabilidades de curación de cualquier tipo de cáncer que pudiera desarrollarse posteriormente⁹⁴.

Este abordaje terapéutico, proclama solucionar los inconvenientes de la terapia génica tradicional, al eliminar cualquier dependencia en selectividad tisular y excluyendo la necesidad de transducir de manera simultánea a millones de células cancerosas. Asimismo, ofrece garantizar la transferencia del transgen en tejidos inaccesibles o en metástasis con escasa irrigación vascular. Para salvar estos inconvenientes la genoprofilaxis propone la estrategia que se describe a continuación.

Como la mayoría de las neoplasias se originan a partir una sola célula (monoclonales), la genoprofilaxis estará dirigida a introducir genes suicidas, no en tejidos tumorales sino, en aquellos tejidos normales en los cuales el cáncer pueda surgir en un futuro. Debido a la naturaleza clonal de los procesos cancerosos, cualquier mutación que ocasione cáncer dentro de las células de tejidos que han sido profilácticamente transducidos, deberá transmitirse de manera conjunta con el gen suicida, a toda su descendencia celular, incluyendo a las zonas de metástasis.

El método de profilaxis génica puede ser aplicado principalmente en tejidos no vitales, como el de próstata o de glándula mamaria. La estrategia consiste en transducir el gen suicida a tantas células normales como sea posible, para maximizar la probabilidad de que un tumor que llegase a surgir, lo haga a partir de una de las células que han sido previamente transducidas. Cualquier intento de promover selectividad celular se torna innecesario, ya que la pérdida de tejido normal durante el tratamiento del cáncer será de poca significancia clínica para el paciente.

La terapia génica profiláctica puede utilizarse en tejidos vitales, pero con una táctica diferente. El enfoque consiste en exponer el tejido a múltiples genes suicidas, diseminados y propagados para formar un mosaico celular, en el cual diferentes células están sensibilizadas a diferentes pro-drogas. Bajo estas circunstancias, el tumor que pueda surgir ulteriormente conservará su sensibilidad a la pro-droga respectiva, ya que emanó de una célula transducida. La sensibilidad será sólo compartida con una pequeña fracción de las células normales, permitiendo así que el tejido vital sobreviva a los efectos de la terapia génica suicida. Ver la **Figura 6**.

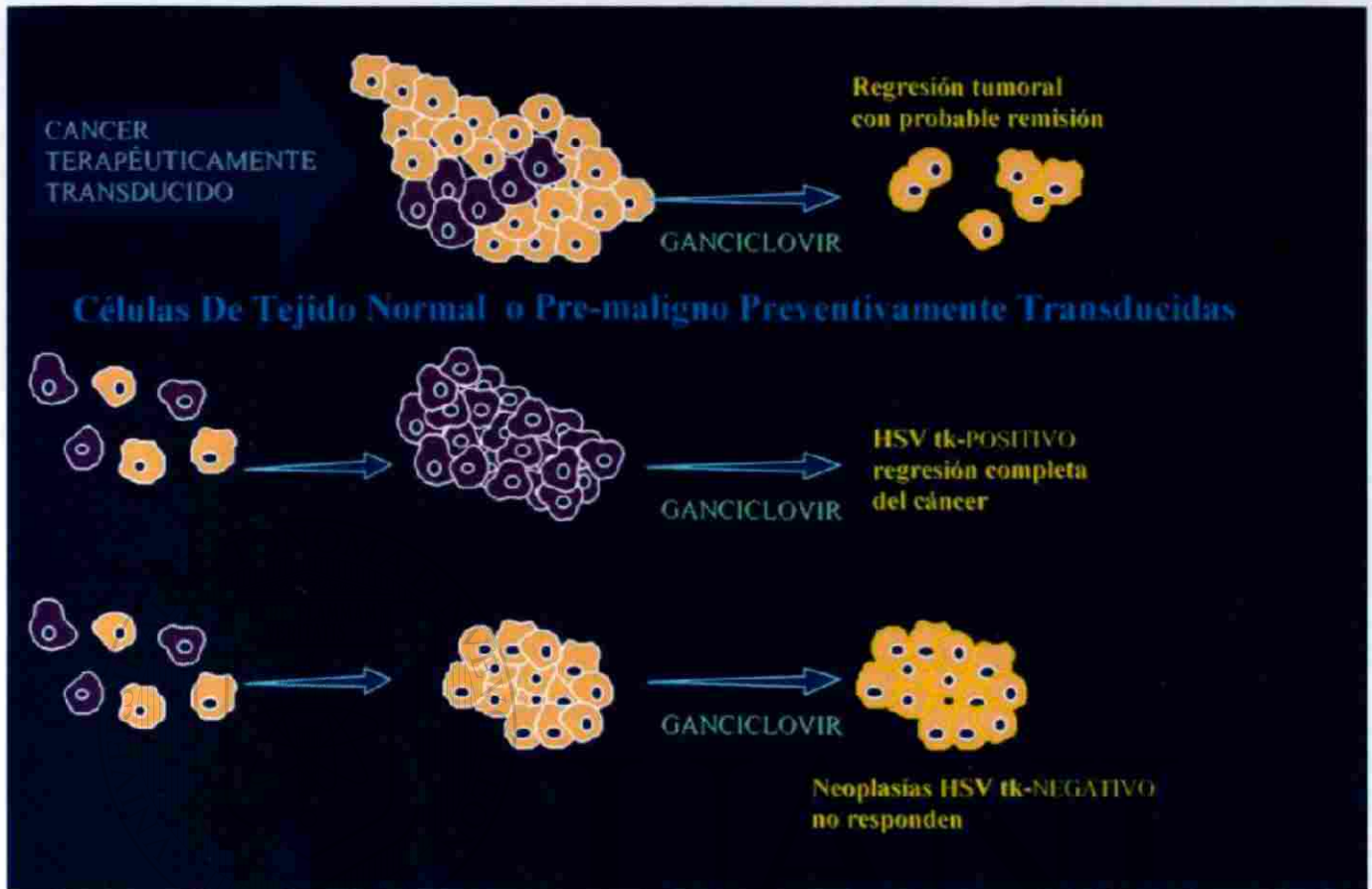


Figura 6. Terapia génica profiláctica. La técnica de genoprofilaxis puede ser la única posibilidad de garantizar que cada célula cancerosa quede expuesta a los efectos de los genes suicidas, demostrando que el cáncer ha surgido de un clon celular que ha sido transducido. [Modificado de Moolten Frederick L. (1997): Suicide genes for cancer therapy. Science & Medicine July/August, 16-25.]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. ANTECEDENTES

Los adenovirus recombinantes de origen humano son ampliamente utilizados en protocolos de terapia génica, tanto en modelos pre-clínicos como en estudios clínicos en fase I. Su explosiva utilización se debe en parte a que los vectores adenovirales de primera generación exhiben una notable y prolongada estabilidad biológica dentro del torrente circulatorio. Esta condición les permite funcionar como excelentes vehículos para transportar genes terapéuticos a varios órganos, diferentes tumores y a diversos tipos de células neoplásicas¹⁶.

A pesar de esta ventaja biológica, existen dos importantes factores que han limitado explotar el potencial de los vectores adenovirales en protocolos de terapia génica. El primer problema es su carencia de especificidad hacia un solo tipo de células huésped. En efecto, los adenovirus pueden infectar un amplio rango de líneas celulares, lo cual hace difícil transportar genes terapéuticos –por vía endovenosa- hacia un determinado grupo de células o hasta un órgano en particular.

Desde una perspectiva oncológica, podemos suponer que los vectores virales portadores de genes suicidas (capaces de activar una pro-droga en un agente citotóxico) pudieran diseminarse desde el sitio de inyección en el tumor, hacia áreas circunvecinas u órganos periféricos sanos y vitales, ocasionando fenómenos de toxicidad no deseada. A pesar de lo anterior, los vectores adenovirales constituyen la mejor opción para el tratamiento de tumores sólidos, debido a la expresión transitoria del gen terapéutico y el supuesto de que estos vectores solamente infectarán el parénquima tumoral y a sus áreas adyacentes^{12, 16, 22}.

Una segunda desventaja observada durante el uso de adenovirus en el tratamiento del cáncer, es el desarrollo de una respuesta inmunológica en contra de las partículas virales dentro del paciente. Bajo tales condiciones, la expresión de los genes terapéuticos es limitada y de carácter transitorio, durando menos de 4 semanas después de la primera inyección. Como el genoma adenoviral eventualmente desaparecerá, en el organismo vivo, el grado de transducción adenoviral de las células blanco puede ser muy bajo, debido a la existencia de anticuerpos preformados en contra del vector o al pronto establecimiento de una respuesta inmunológica en contra de los antígenos de la cápside^{23, 33, 43}.

Durante un ciclo inicial de tratamiento, tales vectores pueden infectar un número apropiado de células y producir una alta expresión de la proteína deseada. Pero pronto, las respuestas celular y humoral desarrolladas por el paciente resultarán en una expresión transitoria del gen terapéutico; ya que los altos niveles de anticuerpos neutralizantes impiden la administración repetida del vector, mientras que los linfocitos T citotóxicos eliminarán a las células que han sido infectadas con el vector adenoviral. Este tipo de respuesta inmune, limita la aplicación de esquemas repetidos de terapia génica y probablemente ha contribuido al fracaso de múltiples protocolos de investigación en fase I^{34, 44, 88, 89}.

Por razones de bioseguridad todos los vectores virales utilizados en protocolos clínicos de terapia génica deben de ser deficientes en su replicación. En teoría los virus pueden ser inhabilitados en su duplicación a través de la eliminación de genes de expresión temprana, que se encuentran ubicados en las regiones E1A y E1B, las cuales codifican para proteínas virales que regulan todas las demás funciones virales. Así, en ausencia de los genes E1, las partículas virales no deberían de replicarse *in vivo*. Sin embargo, cuando estos vectores recombinantes de primera generación son inoculados en el organismo vivo, pueden producir un nivel mínimo o basal de expresión de proteínas virales a pesar de no contar con los genes E1^{56, 64, 78, 81}.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Bajo estas condiciones, las proteínas virales sintetizadas *de novo*, junto con la expresión simultánea del producto de los genes terapéuticos, inducirán la aparición de una respuesta inmune en contra de los antígenos virales.

La respuesta inmunológica observada en modelos animales esta caracterizada por la inmediata aparición de un proceso inflamatorio mediado por neutrofilos, macrófagos y células NK²⁴. El siguiente evento consiste en el establecimiento de una ofensiva citotóxica mediada por linfocitos T auxiliares. Durante esta etapa, las proteínas virales son presentadas por medio de las moléculas clase I del sistema mayor de histocompatibilidad (SMH) a las células T tipo CD8+, las cuales son entonces activadas para formar linfocitos T citotóxicos encargados de destruir a las células infectadas por virus, provocando una disminución en la expresión del gen terapéutico acompañada de inflamación^{83, 89}.

Sincrónicamente, las células auxiliares tipo CD4⁺ son activadas por medio del reconocimiento de proteínas virales presentadas por las moléculas clase II del SMH, estas células juegan un papel de soporte al estimular a los linfocitos T citotóxicos, reforzando así, la respuesta celular inmune. Simultáneamente, se establece una respuesta inmunológica de tipo humoral en la cual los linfocitos B junto con las células auxiliares tipo CD4⁺, son activados por las proteínas de la cápside, presentadas a través de las moléculas clase II del SMH. Esta conjunción de eventos culmina con la producción de anticuerpos neutralizantes que se enlazan con los epítopes de las proteínas de la cápside, impidiendo la incorporación de los virus al ambiente intracelular y obstaculizando la readministración del vector^{80, 83}. Ver la **Figura 7**.

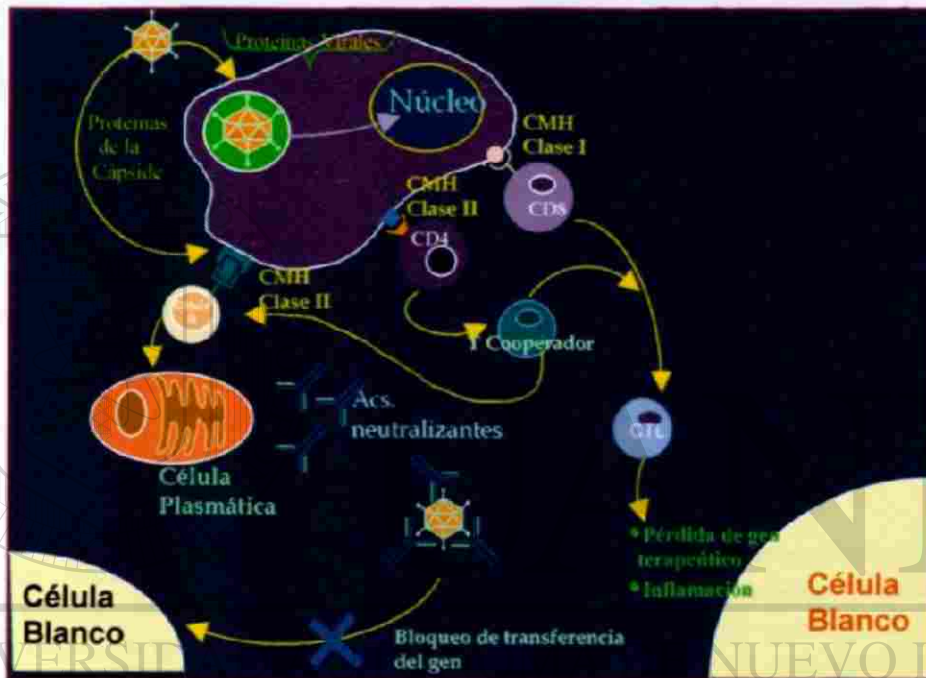


Figura 7. Interferencia inmunológica en la terapia génica con vectores adenovirales. La respuesta inmune montada en contra de las proteínas de la cápside o de las proteínas sintetizadas *de novo* limita la duración de la expresión del gen terapéutico y obstaculiza la administración repetida del virus recombinante.

Considerando que una gran mayoría de los seres humanos han estado expuestos a infecciones por adenovirus a lo largo del tiempo y han desarrollado anticuerpos neutralizantes en su torrente circulatorio y en la mucosa de las vías aéreas. Es lógico suponer, que este tipo de inmunidad protectora se traduce en un importante impedimento para cualquier protocolo de terapia génica basado en la administración de adenovirus. A esta altura, es pertinente puntualizar que en los seres humanos la magnitud de la respuesta inmune no tiene relación con la cantidad de partículas virales administrada, pero si esta íntimamente relacionada con los títulos de anticuerpos pre-existentes y se ve modificada por la ruta de administración del vector. Por otro lado, y a diferencia de los modelos animales, la administración de vectores adenovirales en seres humanos no siempre se traduce en una producción sistémica de anticuerpos neutralizantes^{33,89}.

A la luz de esta evidencia, es sumamente difícil predecir la efectividad de los esquemas de terapia génica en poblaciones humanas. Evidentemente, el desencadenamiento de una respuesta inmune en contra de las proteínas virales o de los productos génicos, pueden limitar la incorporación y distribución de las partículas virales, disminuir su eficacia terapéutica y evitar la administración repetida del vector^{42, 43, 44, 89}.

En contraste con el efecto deletéreo de la respuesta inmune montada contra adenovirus en protocolos clínicos de terapia génica (dirigidos a tratar enfermedades crónico-degenerativas o enfermedades genéticas), la terapia génica del cáncer, presenta un escenario biológico bastante diferente. En el caso de la terapia génica del cáncer, la erradicación del tumor no necesariamente requiere de una prolongada expresión de los genes terapéuticos, situación que es indispensable para el tratamiento de las enfermedades somáticas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ETAPAS EXPERIMENTALES

Los vectores adenovirales están siendo utilizados como vehículos para el transporte de genes en experimentos *in vivo*¹⁶. Una aplicación ideal para el uso de estos vectores es el tratamiento del cáncer mediante esquemas de terapia génica. Los estudios realizados en modelos animales indican que el transporte y expresión de los genes terapéuticos puede ser obstaculizado por el desarrollo de anticuerpos circulantes en contra del vector. Mucha de esta evidencia ha sido obtenida a través de experimentos dirigidos a evaluar los procesos de transferencia y expresión genéticas dentro del hígado y el pulmón^{43, 52, 66, 88, 89, 90}. El micro-ambiente de estos órganos puede ser particularmente sensitivo a la acción de una respuesta humoral y/o celular, a causa de su epitelio mucoso y a su extensa irrigación sanguínea. Nuestro interés ha sido canalizado ha estudiar la expresión de vectores adenovirales en diferentes circunstancias.

Para este propósito decidimos valorar la participación de la respuesta inmune humoral en el tratamiento de los tumores sólidos, los cuales se encuentran pobremente vascularizados y en algunas ocasiones aislados de la circulación general⁸³. Por lo tanto, es razonable especular que bajo estas condiciones, la inyección intratumoral directa de vectores virales pudiera traducirse en una adecuada transferencia y expresión de los genes terapéuticos, debido a que el parénquima tumoral sería menos sensible a la acción de los anticuerpos circulantes, en relación con otros tejidos con mayor vascularidad. Si esto es cierto, podremos observar una mejor expresión del producto proteico y una mayor extensión de sus efectos terapéuticos, con pocas posibilidades de diseminación sistémica. Ver la Figura 8.

Alternativamente, algunos tumores sólidos se encuentran muy vascularizados, por lo que la diseminación de las partículas virales desde el sitio de la inyección, pudiera traer consigo la aparición de reacciones sistémicas o hepato-toxicidad^{6, 18, 34, 76}. Pero paradójicamente, la presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus, pudiera transformarse en un factor de bioseguridad, ya que permitiría administrar dosis masivas de adenovirus por vía intratumoral, sin la diseminación consecuente del vector, garantizando una elevada expresión y persistencia de los genes terapéuticos.

(Ver las Figuras: 9 y 10).

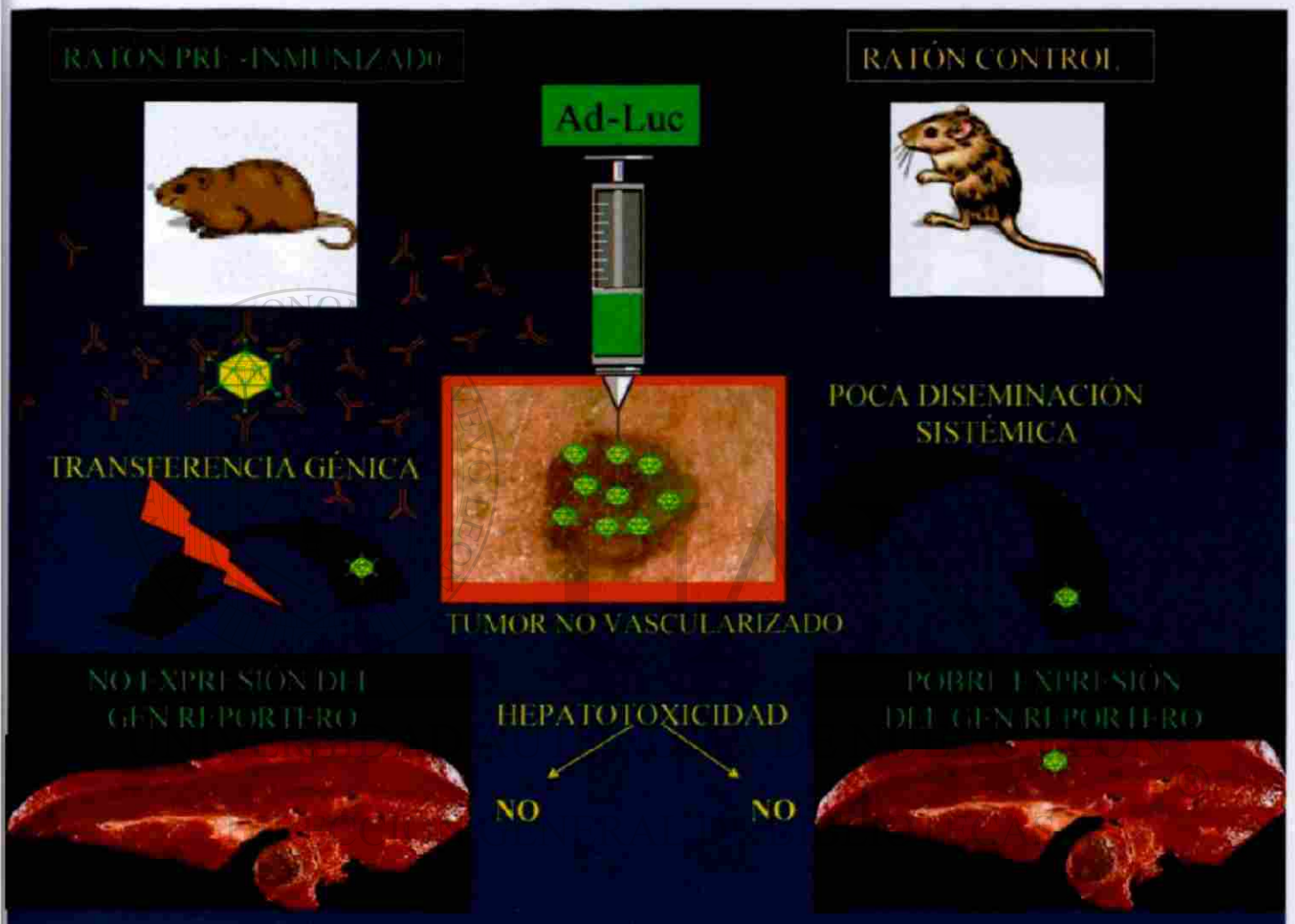


Figura 8. Patrón de diseminación y hepatotoxicidad de un AdV-vector que codifica para luciferasa. En animales control o en ratones preinmunizados, la inyección de AdV-Luc en tumores **no** vascularizados se traduce en una elevada expresión del gen reportero dentro del tumor, así como poca diseminación sistémica con ausencia de hepatotoxicidad.

RATÓN PREINMUNIZADO



RATÓN CONTROL



Ad-Luc



INYECCIÓN INTRA-TUMORAL
EN TUMOR VASCULARIZADO

DISEMINACIÓN SISTÉMICA

HEPATOTOXICIDAD

NO

SI

Bloqueo en la
Transferencia Génica



EXPRESIÓN DEL
GEN REPORTERO

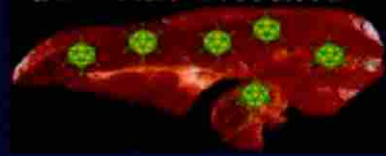


Figura 9. Posibles escenarios de hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado. En los ratones preinmunizados la presencia de anticuerpos en contra de adenovirus limita la expresión de AdV-Luciferasa dentro del tumor y obstaculiza su diseminación sistémica.

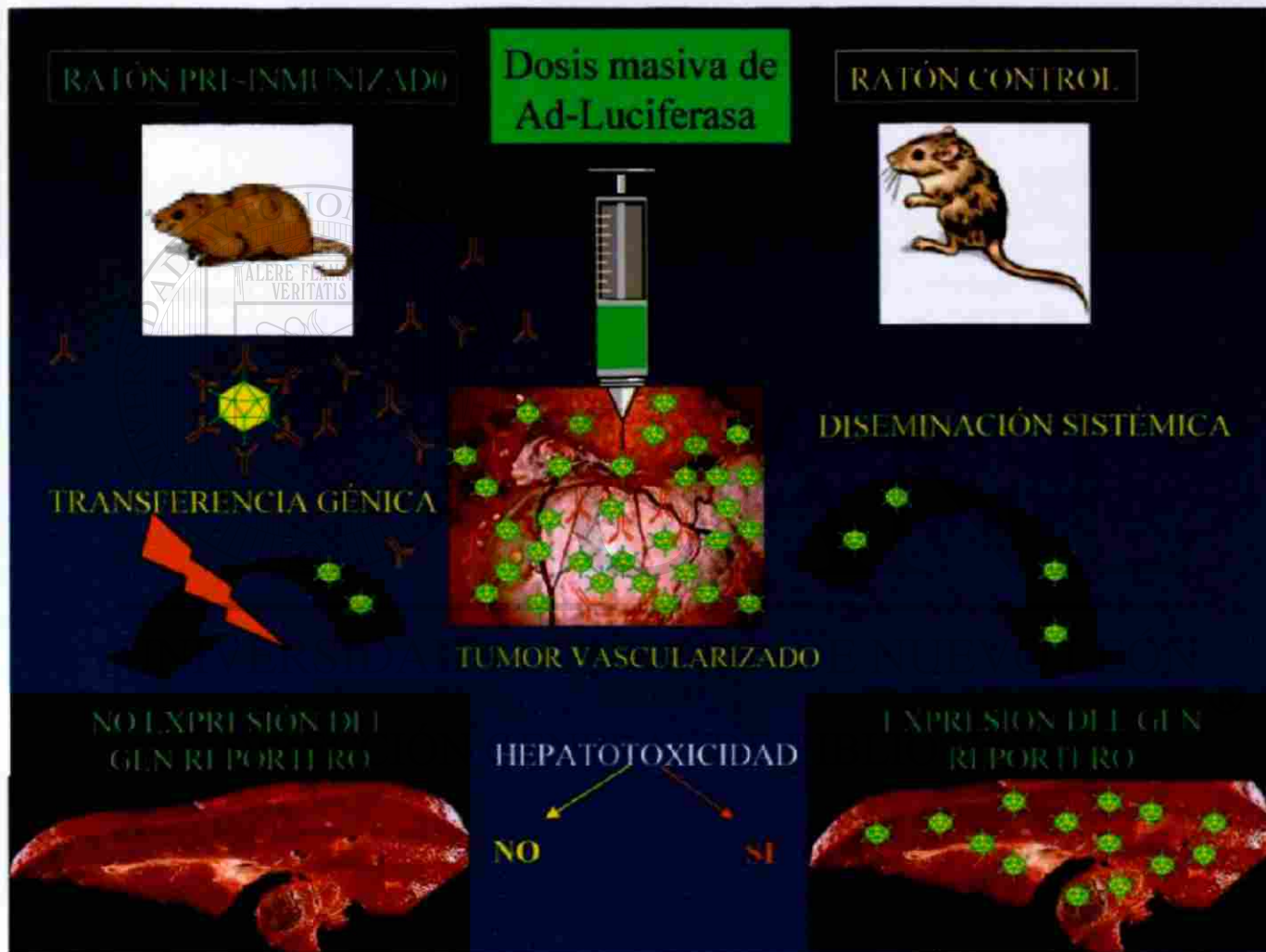


Figura 10. Biodistribución y hepatotoxicidad en un modelo murino portador de un tumor vascularizado que recibe una inyección intratumoral con dosis masivas de AdV-Luc. En este escenario, se observa una elevada expresión de luciferasa a nivel tumoral, mientras que la transferencia y expresión de AdV-Luc a nivel hepático difiere entre animales controles y ratones preinmunizados, debido a que la sobreproducción de anticuerpos evita la aparición de hepatotoxicidad en los ratones preinmunizados.

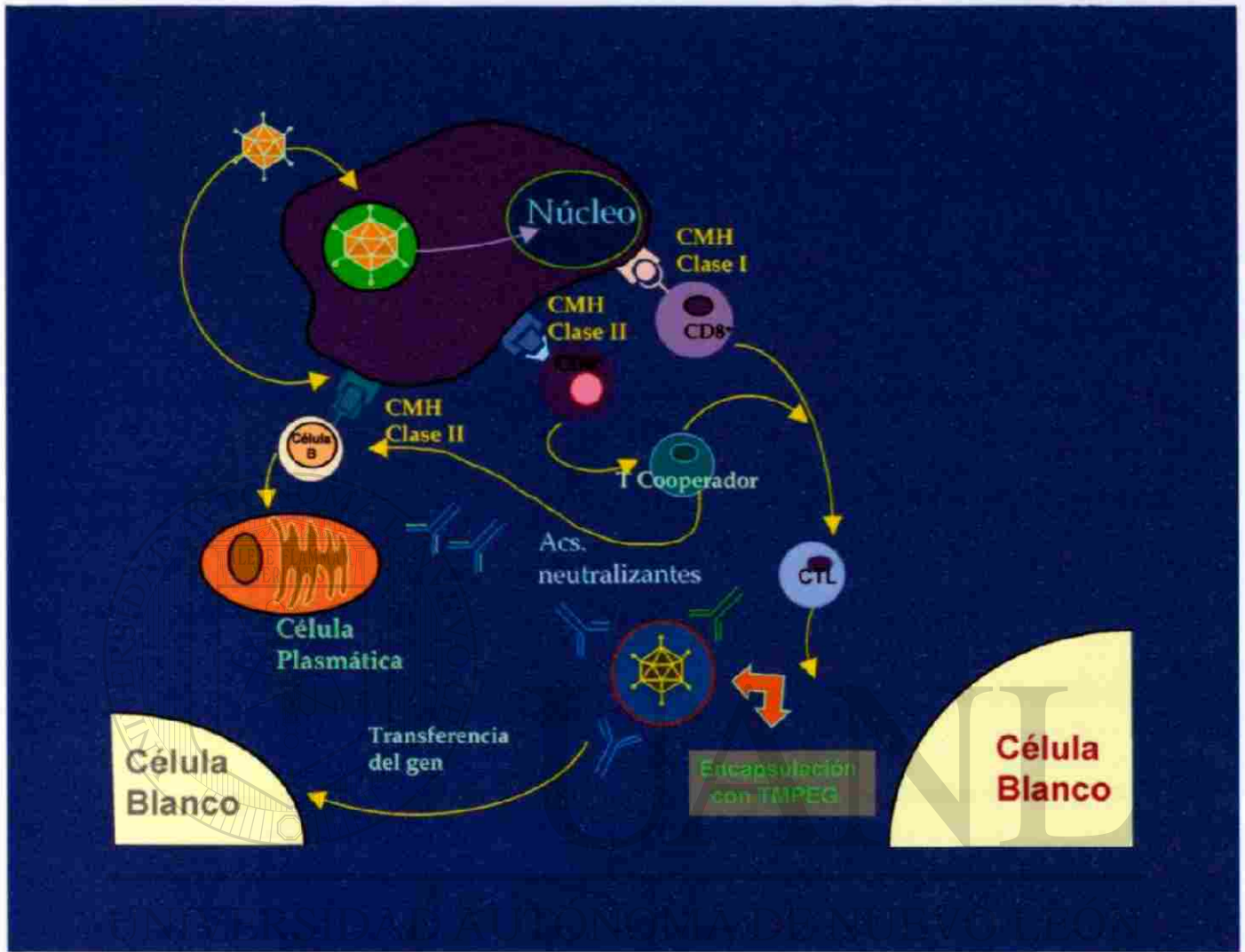
A la luz de esta evidencia, desarrollamos un estudio pre-clínico en un modelo murino preinmunizado en contra de adenovirus portadores del gen reportero que codifica para la enzima luciferasa. El propósito de este trabajo fue investigar la utilidad de la transferencia génica mediada por adenovirus en el tratamiento de tumores sólidos. Para tal efecto, decidimos demostrar como la preinmunización intratumoral con adenovirus modifica el nivel de expresión de las proteínas reporteras. Adicionalmente, intentamos corroborar si la presencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en el torrente circulatorio, pueden limitar la diseminación sistémica del vector después de la inyección intratumoral directa, sin disminuir la transferencia y expresión genéticas.

En caso de corroborar que la presencia de anticuerpos neutralizantes interfiere con una adecuada expresión de los genes reporteros, procedería^{18,34,83,76} disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de enmascarar su superficie recubriéndola con polímeros de Polietilenglicol (PEG), proceso denominado "pegilación".

La PEGilación es un método ya utilizado para disminuir la antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas terapéuticas¹⁵. Existen dos importantes limitaciones de las reacciones de PEGilación: la primera consiste en una disminución de la bio-actividad del complejo PEG-proteína. La segunda limitación depende de la incorporación del grupo activado dentro del complejo PEG-Proteína, y no obstante que el PEG es por si mismo inmunológicamente inerte, la incorporación de esos grupos residuales puede desencadenar una respuesta inmune. Ambos problemas pueden ser evitados por medio de la optimización biológica del método de PEGilación utilizando Tresa-mono metoxipolietilenglicol (TMPEG)²⁰.

Con estos antecedentes, decidimos utilizar el método de optimización biológica de polímeros de PEG para probar si los vectores adenovirales portadores de genes reporteros o terapéuticos pueden ser modificados en su inmunogenicidad reteniendo su capacidad infectiva. Nuestro propósito se fundamenta en el hecho ya conocido de que algunos componentes proteicos de la cápside viral -como las proteínas fibrosas, los pentones y hexones- se unen preferentemente con los anticuerpos neutralizantes durante el establecimiento de una respuesta inmune. Ver la **Figura 11**.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 11. Encapsulación de los adenovirus. En este modelo esquemático las proteínas de la cápside viral reaccionarán covalentemente con el TMPEG durante una reacción de PEGilación, formándose un conjugado TMPEG-proteína que permite enmascarar la superficie de los vectores evitando su reconocimiento por los anticuerpos neutralizantes.

Dentro de todo este contexto, hemos utilizado un modelo murino pre-inmunizado a través de la inyección intratumoral de adenovirus, con la finalidad de investigar la utilidad de la transferencia génica mediada por adenovirus en el tratamiento de tumores sólidos. Para el logro de esta finalidad decidimos estudiar los siguientes postulados:

- 1.- La inyección intratumoral de vectores adenovirales que transportan genes terapéuticos o genes reporteros provoca el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en contra de los antígenos virales.
- 2.- En modelos murinos, la inmunidad humoral pre-existente en contra de adenovirus obstaculiza la transferencia génica y limita la expresión intratumoral y/o sistémica de los genes terapéuticos.
- 3.- Después de la inyección intratumoral del vector, la elevación de anticuerpos en el torrente sanguíneo limita la diseminación sistémica del vector, sin afectar la transducción de las células tumorales.
- 4.- La utilización de dosis crecientes de adenovirus en ratones pre-inmunizados puede restablecer una adecuada expresión de los genes terapéuticos sin incrementar el riesgo de diseminación sistémica del vector.
- 5.- La respuesta inmune humoral es insuficiente para evitar la diseminación del vector hacia los tejidos para los cuales los adenovirus exhiben un tropismo selectivo, por lo cual es posible predecir la aparición de fenómenos de hepato-toxicidad, después de la inyección intratumoral de vectores adenovirales.
- 6.- La inmunogenicidad de los adenovirus puede ser atenuada a través de su encapsulación con polímeros de polietilén glicol.

Para de dar cumplimiento a cada uno de estos enunciados, este trabajo se dividió en tres importantes etapas:

Primera etapa: Dirigida a evaluar el efecto de la inmunidad sobre la expresión de los genes reporteros.

El primer paso de esta etapa fue destinado a estandarizar un modelo murino de tipo heterotópico, que permitiera el trasplante singénico de la línea celular TM40-D (que produce tumores mamarios en el ratón) en el tejido celular subcutáneo de ratonas Balb/c. El segundo paso consistió en estudios inmunológicos destinados a evaluar los niveles de anticuerpos específicos en contra de adenovirus, así como la titulación de anticuerpos neutralizantes. Posteriormente, se determinó su posible relación con los procesos de transferencia y expresión génica de los genes reporteros.

Segunda etapa: Se investigó si con la inyección intratumoral de dosis crecientes de adenovirus en ratones normales y preinmunizados, es posible obtener altos grados de expresión genética de los genes reporteros, sin presentar complicaciones de diseminación sistémica del vector o aparición de fenómenos de hepatotoxicidad.

Tercera etapa: Fue dirigida a disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de su encapsulación (PEGilación) con polímeros de polietilenglicol.

4. JUSTIFICACIÓN

Los tumores malignos que afectan a los seres humanos son usualmente curables si se detectan en etapas tempranas de su desarrollo. En los Estados Unidos de América, las tasas de mortalidad han disminuido significativamente durante la última década, debido a los sistemas de detección precoz y a un mejor tratamiento de las lesiones precancerosas, así como de tumores en estadios tempranos de desarrollo.

Asimismo, el perfeccionamiento de los métodos diagnósticos a nivel molecular, ha mejorado los aspectos pronósticos y las expectativas de vida de muchos pacientes con cáncer. Sin embargo, aún queda mucho por hacer. Siendo optimistas, tal vez en corto tiempo mediante el uso de estrategias de terapia génica sea posible lograr la destrucción selectiva y efectiva de las células tumorales.

Dentro del campo de las aplicaciones de la terapia génica en el hombre, se puede considerar al cáncer como el área más importante y de más rápida expansión. Durante los últimos 5 años un 75% de los pacientes enlistados en protocolos de terapia génica han recibido el tratamiento para la erradicación de neoplasias malignas, principalmente tumores. La justificación del tratamiento radica en el fácil abordaje y biodisponibilidad de los tumores sólidos y a la facilidad de lograr una rápida y eficiente acumulación del gen terapéutico dentro del parénquima tumoral. Bajo estas condiciones, la expresión transitoria de los genes terapéuticos puede ser una ventaja adicional, ya que disminuye el riesgo de toxicidad sistémica, garantizándose una exposición aguda -aunque de corta duración- de las células tumorales a los efectos de las pro-drogas.

Dentro de este escenario, el factor de limitación más importante es la condición de inmunogenicidad de los vectores virales. Por tal motivo, la mayor parte de los experimentos pre-clínicos realizados *in vivo* se han efectuado en modelos murinos inmuno-deficientes o en animales inmuno-deprimidos. Por lo tanto, resulta muy difícil predecir que tan efectivos pueden ser ese tipo de tratamientos en los seres humanos previamente expuestos a los adenovirus.

Por otro lado, pudiera parecer conveniente conservar un adecuado estado de inmuno-competencia para coadyuvar con la eliminación de las células cancerosas. Sin embargo, esto no es descabido, ya que en la práctica, la producción de anticuerpos contra adenovirus contribuye más a la eliminación del vector terapéutico, que a la erradicación de las células neoplásicas.

Con base a estos antecedentes, se justifica investigar la utilidad de inocular vectores adenovirales por medio de la inyección directa del vector dentro del parénquima de tumores sólidos y evaluar si la pre-inmunización contra adenovirus puede modificar la eficacia terapéutica de los esquemas de terapia génica utilizados en el tratamiento del cáncer. La importancia de esta nueva área de investigación es incuestionable, sobre todo si tomamos en consideración la gran cantidad de variables que interfieren con el tratamiento integral y exitoso de los pacientes con cáncer.

Una justificación adicional deriva del conocimiento que los esquemas tradicionales de tratamiento del cáncer consisten en el uso de cirugía en combinación con radioterapia o quimioterapia. Sin embargo, una gran variedad de tumores malignos y los carcinomas diseminados no son controlables por cirugía y no responden a terapias alternativas. Consecuentemente, las expectativas de vida a largo plazo por lo general no exceden del 15% al 30%.

A causa del limitado impacto que tienen la cirugía y la radioterapia en el tratamiento de los pacientes con cáncer, se justifica desarrollar nuevos métodos terapéuticos, que permitan mejorar las expectativas de vida y evitar la aparición de complicaciones.

Dentro de las nuevas opciones terapéuticas se encuentra la terapia génica, la cual es improbable que reemplace a los esquemas terapéuticos ya existentes, no obstante, puede contribuir de manera significativa en el tratamiento de cánceres refractarios al tratamiento convencional y en el control de la enfermedad metastásica. Debido a su enorme potencial para inducir la regresión del crecimiento tumoral, sin la presentación de toxicidad agregada.

5. HIPOTESIS

5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

H1.

En el ratón preinmunizado que recibe una inyección intratumoral de adenovirus portadores de los genes GFP/Luc, la eficacia en la transducción y expresión de los genes reporteros será modificada por la presencia de anticuerpos circulantes. Los niveles de expresión intratumoral a lo largo del tiempo serán modificados por la presentación de anticuerpos neutralizantes.

H2.

La inyección intratumoral de altas dosis de adenovirus en ratones preinmunizados, restablecerá los niveles de expresión génica de los genes reporteros sin presentar complicaciones secundarias a la diseminación sistémica del vector.

H3.

De presentarse la inmunidad humoral en contra de adenovirus, esta puede ser ventajosa, ya que evita la diseminación del vector, mientras permite un adecuado nivel de transferencia y expresión genética de los genes de interés.

H4.

La respuesta humoral provocada por los anticuerpos neutralizantes en contra del vector adenoviral, puede ser atenuada a través de la encapsulación de los vectores adenovirales con polímeros de polietileno glicol (TPMG).

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar si la inyección intratumoral de vectores adenovirales induce o no la producción de anticuerpos neutralizantes en contra de subsecuentes inyecciones de los vectores modificando la eficiencia de la expresión de genes reporteros portados por éstos.
2. Determinar si en el caso de montarse una respuesta inmune, la inyección intratumoral subsecuente de dosis crecientes de vectores adenovirales, se traduce en una elevada expresión de la proteína reportera en el sitio de inyección, sin presentar diseminación sistémica de las partículas virales administradas.
3. Evaluar los aspectos de toxicidad general y de hepatotoxicidad asociados con la inyección de dosis crecientes de adenovirus en ratones preinmunizados, a través de la cuantificación de enzimas hepáticas (Alaninaminotransferasa, Aspartatoaminotransferasa y Fosfatasa Alcalina) y de la evaluación anatomopatológica de diferentes tejidos (Hígado, Bazo, Ovario, Pulmón, y Corazón) extraídos de cada uno de los animales pertenecientes al estudio.
4. Determinar si la encapsulación de adenovirus con TMPEG disminuye la inmunogenicidad del vector o lo torna resistente a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Reproducir un modelo murino de tipo heterotópico para generar tumores mamarios en el espacio celular subcutáneo de ratonas de la cepa Balb/c,
- B. Estandarizar las condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de la línea celular TM-40D, destinada a generar tumores mamarios singénicos.
- C. Conocer el tiempo que se necesita para generar tumores sólidos en los animales en estudio y definir el número de células necesario para producir dichas neoplasias.
- D. Inducir la generación de tumores singénicos en ratonas de la cepa Balb/c, mediante su inoculación con células de la línea TM-40D, por vía subcutánea.

E. Preinmunizar una población de ratones por medio de la inyección de diferentes vectores adenovirales utilizando diferentes vías de inoculación, y determinar los niveles de producción de anticuerpos antes y después de la inoculación del adenovirus.

F. Correlacionar el nivel de producción de anticuerpos con los niveles de expresión genética de los genes reporteros GFP/Luciferasa administrados por subsecuentes inyecciones de vectores adenovirales que los portan, y determinar si ambas variables son modificadas al utilizar diferentes vías de administración del vector.

G. Efectuar los correspondientes ensayos de luciferasa, inmunofluorescencia, anticuerpos neutralizantes, y ELISA en muestras de hígado, piel, ovario, bazo y tumor, así como en el suero de cada uno de los animales en estudio.

H. Evaluar la transferencia y expresión de luciferasa en un grupo adicional de ratones con inmunidad pre-existente en contra de Ad-5, a los cuales se les administrarán dosis crecientes de Ad/Luc por medio de la inyección intratumoral del vector.

I. Evaluar los títulos de las enzimas hepáticas Alanin aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) en el suero de los animales preinmunizados que recibieron dosis crecientes de adenovirus y compararlo con los títulos reportados en los animales control.

J. Realizar estudios anatomopatológicos en el hígado, bazo y pulmón de los animales tratados, con la finalidad de detectar cambios morfológicos, necrosis o inflamación tisular.

K. Encapsular los vectores adenovirales AdLuc, AdGFP y AFT2M mediante una reacción de PEGilación y valorar si la expresión genética de las proteínas codificadas por estos genes reporteros se ve modificada en presencia y ausencia de anticuerpos neutralizantes en contra de adenovirus.

7. MATERIAL Y METODOS

El Presente trabajo de tesis se realizó en el Gene Vector Laboratory. Feigin Cancer Center. Texas Children's Hospital & Baylor College of Medicine., el Radio-Gene Therapy Laboratory del Veterans Affairs Medical Center de Houston Texas., y en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México.

7.1 MATERIAL

7.1.1 VIRUS Y VECTORES:

Los vectores adenovirales utilizados en este estudio pertenecen a la subclase C, serotipo Ad-5 de la familia Adenoviridae. Estos fueron construidos por el Dr. Estuardo Aguilar-Cordova, según el método propuesto por Rosenfeld y Bett⁴ dentro del Gene Vector Laboratory del Center for Cell and Gene Therapy del Baylor College of Medicine, de acuerdo a las normas de las buenas prácticas de laboratorio utilizando condiciones estándar.^{5,32,78}

El primer vector (Adv-GFP) expresa una proteína reportera regulada por el promotor de CMV. La secuencia de DNA exógeno se insertó dentro de la región E1 y codifica la secuencia de 238 aminoácidos de la proteína verde fluorescente o GFP. La GFP se presenta en forma de monómero en solución, y emite luz verde cuando es excitada con luz ultravioleta o luz azul, por lo que es fácilmente detectada por microscopía de inmunofluorescencia. Este vector fue utilizado para preinmunizar los primeros grupos de animales. Adicionalmente fue utilizado para conocer los niveles de expresión del gen reportero desde un punto de vista cualitativo.

Para determinar la expresión cuantitativa de los genes reporteros se utilizó un segundo vector (Adv-Luc) de origen humano, portador de una secuencia exógena, que codifica para una proteína enzimática conocida como luciferasa (una proteína monomérica de 62 kDa). Adv-Luc, contiene un casete de expresión en la región E1, construido con el promotor de Citomegalovirus (CMV), el DNA_c que codifica para luciferasa y la señal de poli-adenilación de SV40.

Ambos vectores adenovirales fueron propagados en células 293 y posteriormente purificados por centrifugación diferencial en gradientes de cloruro de cesio.^{3,61} Finalmente, durante la etapa de preinmunización se utilizó el Adv-5 AFT2M59 carente de genes reporteros ("gutless"), el cual fue empleado para inducir la producción de anticuerpos en el grupo de animales pre-inmunizados.

7.1.2 ANIMALES.

Durante cada una de las diferentes etapas de este programa de investigación se utilizaron ratones de 6 semanas de edad pertenecientes a la cepa Balb/c, de 20g de peso y del sexo femenino (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN). También se utilizaron ratones inmunodeficientes de la cepa RAG-2 (recombinase activating 2 gene). Los ratones homocigotos para la mutación en el gen RAG-2 carecen de células B y células T, ya que la delección de este gen ocasiona un bloqueo en la diferenciación temprana de estas líneas celulares.

Los procedimientos efectuados en los animales, fueron realizados en los bioterios del Feigin Cancer Center del Baylor College of Medicine y del Veterans Affairs Medical Center, de Houston Texas. Como criterio de terminación del experimento se decidió sacrificar a los animales con un crecimiento tumoral mayor de 2250 mm³ o de un peso igual o mayor al 10% del peso corporal. También se sacrificaron los animales enfermos que presentaron caquexia, dificultad respiratoria, hipoactividad y ataque a su estado general. La eutanasia se efectuó por asfixia en una atmósfera saturada con CO₂.

7.1.3 LÍNEAS CELULARES

Para inducir el crecimiento de tumores en los animales experimentales se utilizó la línea celular TM40-D. Esta línea se deriva de ratonas vírgenes normales de la cepa Balb/c y se generó a partir de células murinas del epitelio mamario (FSK) cultivadas durante períodos de tiempo variable. Las células FSK fueron inyectadas en el tejido adiposo de las almohadillas mamarias de modelos murinos y después de 11 pasajes seriados las células transplantadas generaron tumoraciones alveolares preneoplásicas con gran capacidad de tumorigénesis⁴⁷.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 ENSAYO DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para determinar los niveles de anticuerpos específicos en contra de adenovirus en el plasma de los animales preinmunizados y en los animales controles, se utilizó un método indirecto de ELISA⁹³, en donde el adenovirus-5 AFT2M59 fue utilizado como antígeno. Para este propósito se utilizó una solución de 8.87X10¹² VP/ml, las partículas virales fueron fijadas por enlaces no covalentes en la base de una microplaca de titulación con 96 celdillas y el exceso de antígeno se lavó con una solución de amortiguador de fosfatos y detergente tween 20 (Phosphate Buffered Saline Plus Tween 20 (20X). Cat. RP 0014. ScyTek Laboratories. Logan Utah, U.S.A). Las celdillas fueron llenadas con superblok blocking buffer en PBS (Pierce. Rockford, Illinois. U.S.A. Cat. No. 37515) para bloquear los epítopes inespecíficos de las proteínas que pudieran unirse con los anticuerpos y obstaculizar el ensayo. Enseguida, se añadieron las muestras de suero en las celdas correspondientes; cualquier anticuerpo específico contra adenovirus se uniría a la fase sólida. El complejo de antígeno-anticuerpo fue cuantificado por medio de una técnica de "sándwich" utilizando un conjugado de anti-inmunoglobulina-enzima (Pierce Cat. No. 32490.), el cual se une al anticuerpo anti-Ad-5 previamente fijado en la fase sólida. Finalmente, se añade el sustrato para la enzima (3,3',5,5'-tetramethyl Benzidine Substrate Solution. Pierce Cat. No. 3402.) que produce una reacción colorimétrica, la cual es cuantificada como un incremento en la absorbancia a través de un espectrofotómetro (ELX800 Universal Microplate Reader Bio-Tek Instruments). Ver la **Figura 12**.

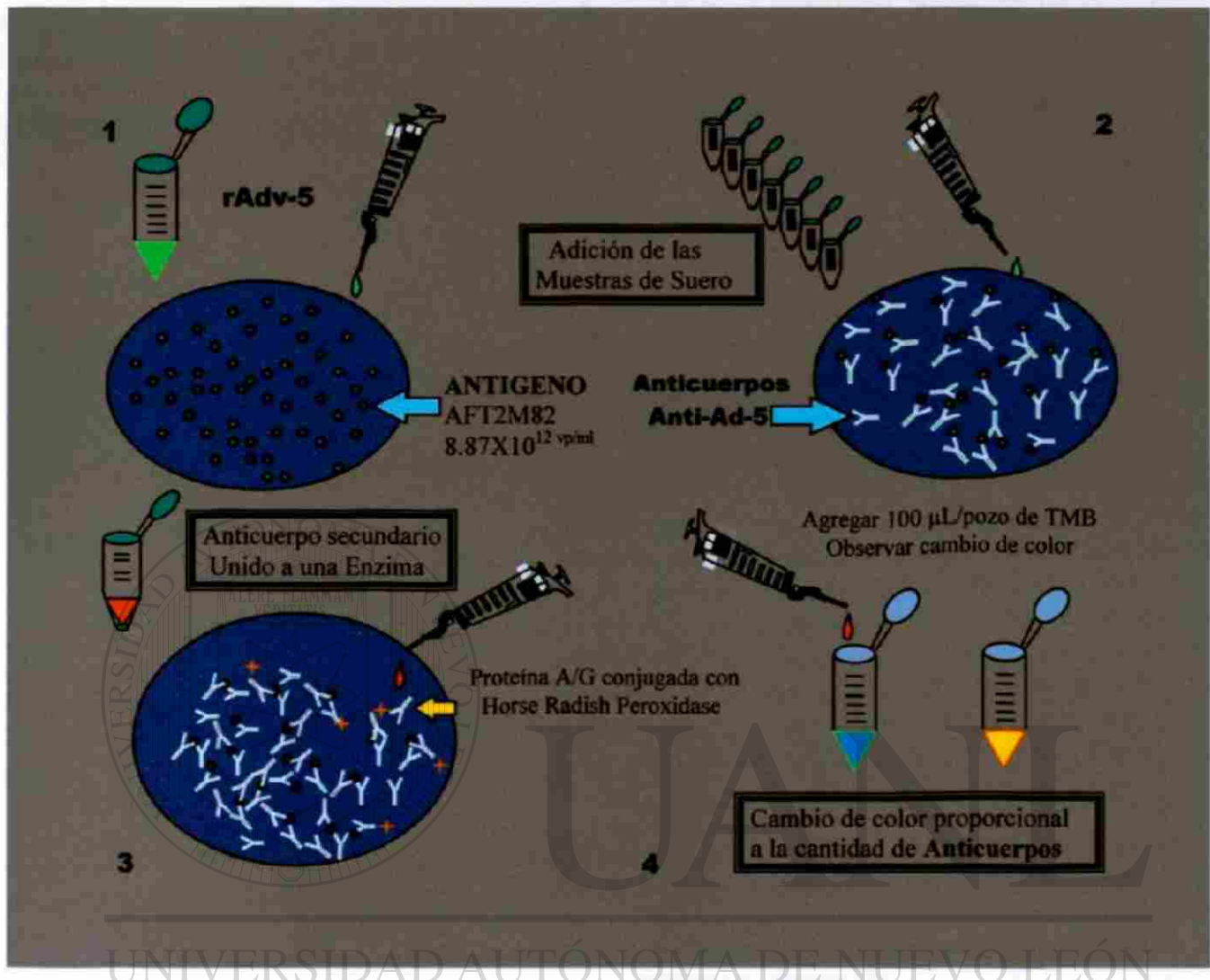


Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA. El procedimiento se explica por medio de cuatro pasos secuenciales: el primero es la fijación del antígeno en el fondo de la placa, el segundo es la formación del complejo antígeno-anticuerpo, el tercero es la formación de un sándwich mediante la unión del primer y segundo anticuerpo, y el cuarto es la producción de una reacción colorimétrica después de la reacción enzima-substrato.

7.2.2 ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN DE ADENOVIRUS

Esta técnica, se realiza en células en cultivo y tiene como finalidad medir la capacidad de los anticuerpos -específicos contra adenovirus- para inhibir la infección (lisis) de las células por las partículas virales en estudio. Usualmente, el anticuerpo es mezclado con el agente viral y posteriormente incubados por un tiempo variable. Posteriormente, la mezcla es agregada al cultivo de células. El título de neutralización es visualizado como un marcador subrogado de la habilidad del anticuerpo para prevenir la infección *in vivo*²³.

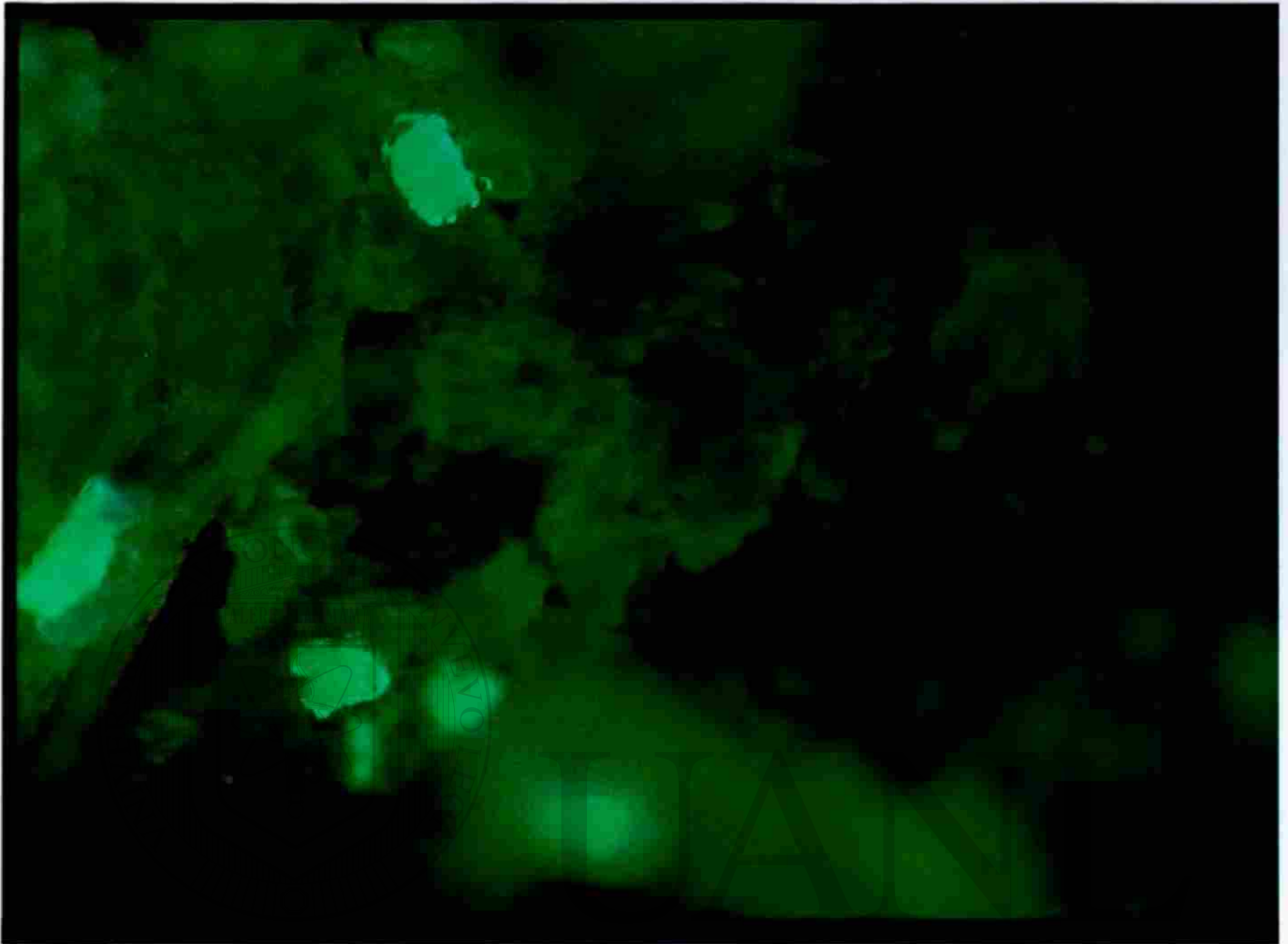
Para tal efecto, Se emplearon placas de 96 cavidades donde se mezclaron 50 μ L de las diferentes diluciones del suero con igual volumen de cada uno de los aislamientos virales (100 TCID₅₀ U_i/0.05ml). Las diluciones fueron realizadas en medio MEM suplementado con suero fetal de ternera al 2% inactivado por calor. Después de incubar durante 1 h a 37 °C, se adicionaron 100 μ L de una suspensión de células Vero -en medio 199 con suero fetal de ternera al 10 % - a una concentración de 2X10⁵ células/ml. Enseguida las placas fueron incubadas a 37⁰C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 3-5 días.

Los resultados fueron obtenidos cuando el título de infectividad del virus fue de 30 a 300 TCID₅₀ U_i. El título de neutralización fue considerado como \geq 50% del efecto citopático (CPE) comparado con el control.

7.2.3 ENSAYO DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP-ASSAY).

A pesar de que los vectores adenovirales pueden infectar a un gran número de células, existe gran variación en el grado de transducción entre diferentes tipos de tejido. Con el objeto de cuantificar la eficiencia en la transducción de los diferentes vectores virales, se ha modificado su genoma, insertándoles genes exógenos que expresan marcadores biológicos con actividad enzimática o de luminiscencia. Un ejemplo de este tipo de vectores que codifican para genes reporteros, es el Adv-Luciferasa, en donde la actividad de la proteína reportera es fácilmente detectada por medio de un ensayo enzimático⁶¹. Aunque los ensayos enzimáticos para detectar proteínas reporteras son de suma utilidad en la cuantificación de las proteínas reporteras, ninguno de ellos permite visualizar la presencia *-in situ-* del gen reportero y por ende de la partícula viral que lo transporta. Por esta razón decidimos utilizar Adv-GFP para demostrar la eficacia de la transferencia y expresión génicas después de la inyección intratumoral de Adv-GFP.

La expresión de GFP fue visualizada utilizando un microscopio de inmunofluorescencia. Para tal efecto, los animales fueron sacrificados a los 2, 7, 14 días después de la inoculación de Adv-GFP, luego se les practicó la necropsia y extracción del hígado, bazo, ovario y tumor. Posteriormente, cada órgano fue observado bajo el microscopio de fluorescencia con la finalidad de obtener un estudio cualitativo de la expresión de GFP mediada por adenovirus, como se muestra en la figura 13.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 13. Microfotografía de células tumorales transducidas con AdV-GFP. Nótese la emisión de fluorescencia emitida por la proteína reportera expresada por el transgen en aquellas células que han sido transducidas con el vector.

7.2.4 ENSAYO DE LUCIFERASA

Para determinar cuantitativamente los niveles de expresión de los genes reporteros se utilizó un adenovirus portador de la secuencia reportera que codifica para luciferasa. La actividad de la enzima fue determinada por medio del ensayo de luciferasa (Promega Madison, WI. U.S.A. Cat. E1500). Para iniciar el ensayo, cada tejido/órgano fue lavado con buffer de fosfatos y cada muestra fue colocada en tubos de polipropileno conteniendo 2 ml de buffer de lisis [25 mM Tris -phosphate pH 7.8, 2 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM 1,2 diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100]. Posteriormente, cada uno de los tejidos en estudio fue sometido a homogenización mecánica utilizando un homogenizador (Ultra-Turrax laboratory disperser/homogenizer, IKA works # 27950-00). Cada homogenizado fue sometido a centrifugación a 2000 RPM X 2min, con la finalidad de eliminar el sedimento de detritus celulares, mientras que el sobrenadante fue almacenado a -80°C . Para medir la actividad de luciferasa se mezclaron 20 μl de cada homogenado con 100 μl del reactivo de luciferasa [20Mm tricine, 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \text{Mg} (\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67 Mm MgSO_4 , 0.1 Mm EDTA, 33.3 Mm DTT, 270 μM coenzyme A, 470 μM luciferina, 530 μM ATP, final pH 7.8]. Inmediatamente después se cuantificó la emisión de luz durante un periodo de 10 segundos en un luminómetro modelo TD-20/20. (Ver la Figura 14.).

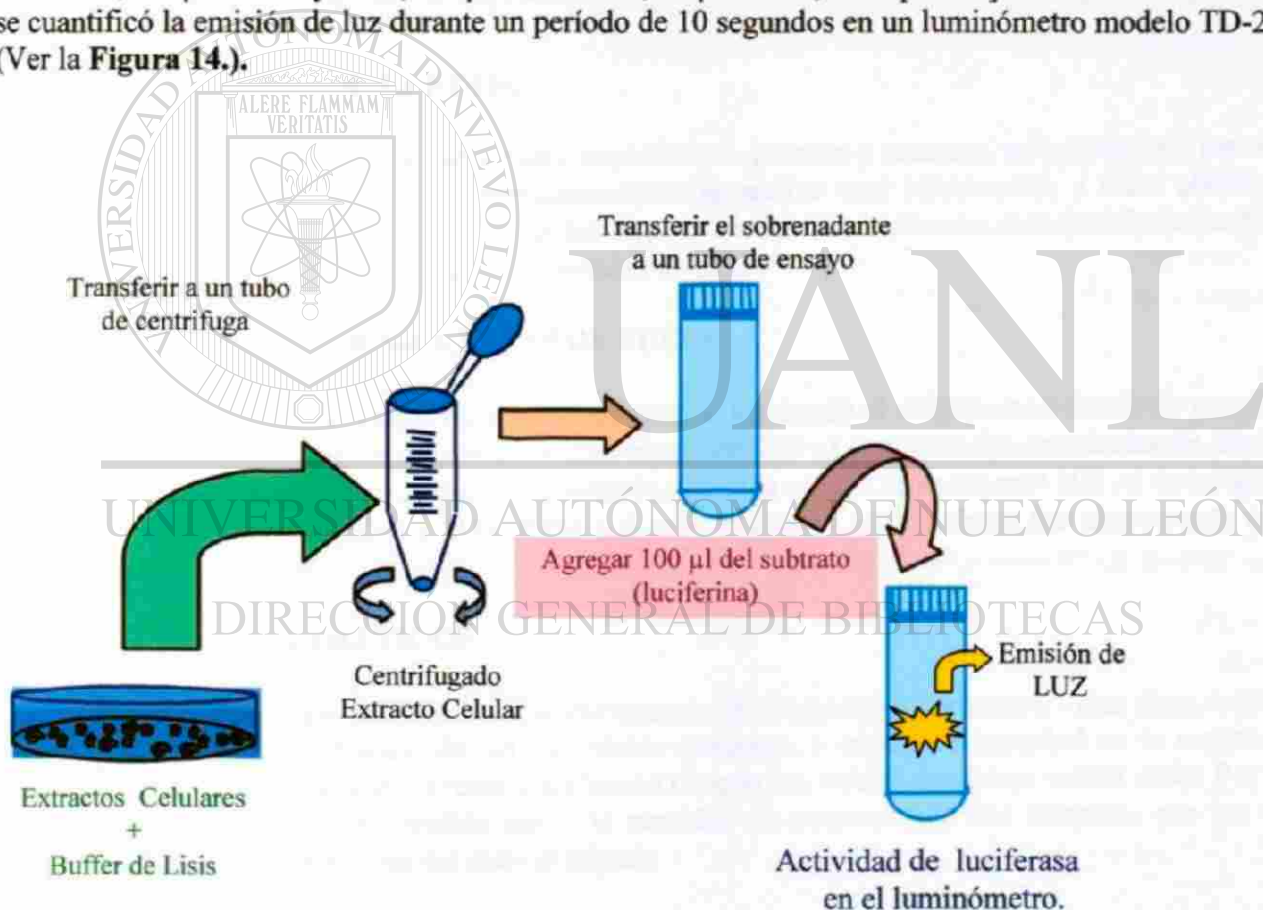


Figura 14. Ensayo de luciferasa. Las reacciones químicas que ocurren durante el ensayo de luciferasa producen luz. Los componentes de la reacción son: el oxígeno, el sustrato luciferina y la enzima luciferasa. El oxígeno se pone en contacto con la luciferina y la oxida, en presencia de la luciferasa, para formar luciferina oxidada. La energía necesaria para la reacción proviene del ATP. Una vez formada la luciferina oxidada, ella se descompone espontáneamente y se regeneran la luciferina inicial y el oxígeno, y el exceso de energía que fue facilitada por el ATP es liberada en forma de luz.

7.2.5 TUMORIGÉNESIS

Para establecer el modelo de tumorigénesis se utilizó la línea celular TM40-D con la finalidad de producir una fenocopia de tumores ortotópicos en ratones Balb/c y poder investigar los efectos de la respuesta inmune humoral sobre la transferencia y expresión genéticas de tumores inyectados con vectores adenovirales. Para este propósito, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (Nembutal[®], Abbott Laboratories, Chicago, IL) a una dosis de 50 mg/kg. Posteriormente, cada animal fue inoculado con células TM40-D a una concentración de 6×10^6 , la inyección se efectuó por vía subcutánea en el flanco posterior derecho con un volumen de 50 μ l.

Después de un período de tumorigénesis de 3-4 semanas -en el cual los tumores alcanzaron un diámetro de 50 a 60 mm³,- los animales fueron inmunizados con dos diferentes vectores virales (ADV-GFP o AFT2M59) a una dosificación de 1×10^{11} VP/20 μ l. Para evaluar el crecimiento tumoral los tumores fueron medidos cada 4 días en sus 2 ejes perpendiculares, utilizando un calibrador digital tipo vernier; el volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula $(a \times b^2)/2$, en donde a es el eje mayor y b es el eje menor del tumor⁶⁰.

7.2.6 RECOLECCIÓN DE TEJIDOS.

Para la obtención de las muestras de hígado, bazo, ovario, pulmón y tumores, se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical. Inmediatamente se realizó una laparotomía a cielo abierto y se procedió a disecar y remover a cada uno de los órganos en estudio. Todas las muestras fueron colocadas en recipientes con nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C.

7.2.7 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

La extracción de sangre se realizó bajo anestesia general siguiendo el método modificado de punción del seno retro-orbital, para ello se utilizó una micro-pipeta de 200 μ l con puntillas embebidas de heparina y cortadas en forma diagonal para facilitar la punción. De cada animal se extrajeron 200 μ l de sangre total, los cuales fueron centrifugados a 2000 RPM x 4 min, el plasma sobrenadante fue almacenado a -80° C para su estudio posterior.

7.2.8 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Las enzimas hepáticas son proteínas que se encuentran en el hígado en concentraciones altas, también es posible encontrarlas en el músculo, en las células cardiacas y en menor cantidad en la sangre. Estas enzimas son liberadas hacia el torrente circulatorio cuando las células hepáticas sufren daño. Por medio de ensayos de laboratorio es posible medir la cantidad de enzimas que son liberadas por las células hepáticas y estimar la extensión del daño al hígado.

Para la determinación de la actividad de enzimas hepáticas se cuantificaron los títulos de las enzimas Alanina Aminotransferasa (ALT), Aspartato Aminotransferasa (AST) y Fosfatasa Alcalina (ALP). Los valores respectivos son reportados en Unidades Internacionales por Litro.

7.2.9 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Durante la necropsia de los animales se procedió a recolectar los diferentes tejidos bajo estudio. Cada órgano fue sumergido en formol, después de su fijación los bloques fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. Los cortes se realizaron en un microtomo, obteniéndose una cinta de rebanadas de tejido de 5 a 8 micras de espesor. Finalmente, los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina y se examinaron con el microscopio de luz.

El hígado, pulmón y bazo de cada animal fueron examinados para la búsqueda de hepatitis, neumonía intersticial e hiperplasia esplénica. Los cambios histológicos fueron catalogados con una escala del 0 al 4, en donde el cero representa la morfología normal y el 4 severa inflamación, hiperplasia o necrosis.

7.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos durante los ensayos de luciferasa, ELISA y anticuerpos neutralizantes en los diferentes grupos de estudio, se realizó por medio de la prueba T de Student y del análisis de varianza unidireccional.

El análisis de varianza unidireccional (oneway ANOVA). Es una prueba estadística para analizar si más de dos grupos difieren significativamente entre sí, en cuanto a sus medias y varianzas. El análisis de varianza unidireccional produce un valor conocido como "*F*" o razón "*F*", que se basa en una distribución muestral, conocida como la *distribución "F"*. La razón "*F*" compara las variaciones en las puntuaciones debidas a dos diferentes fuentes: Variaciones *entre* los grupos que se comparan y variaciones dentro de los grupos.

El análisis de varianza fue utilizado para probar la hipótesis de que varias medias son, o no iguales y es una extensión de la prueba "*t*", ya que la prueba "*t*" es utilizada para dos grupos mientras que el análisis de varianza unidireccional se usa para tres, cuatro o más grupos.

Una vez que determinamos las diferencias que existen entre las medias fue conveniente conocer cual de las medias fue la que difirió. Como el análisis de varianza unidireccional solamente nos señala si la diferencia entre las medias y las distribuciones de los grupos es o no significativa, pero no nos indica a favor de que grupo lo es. Adicionalmente decidimos comparar cada par de medias y determinar exactamente en donde pueden estar las diferencias significativas. Para tal propósito se utilizó un contraste a posteriori, comparando las medias y las distribuciones dentro de los grupos.

Para el correcto cumplimiento de cada uno de estos puntos, utilizamos un paquete estadístico para computadora (SPSS Versión 11.0), el cual contiene pruebas estadísticas para contrastes a posteriori en el análisis de varianza unidireccional. Nosotros utilizamos la prueba de diferencia significativa mínima (LSD) y la prueba "post hoc" de comparaciones múltiples. El valor α (alfa) que se eligió para nuestro estudio fue a un nivel de significancia del .05 expresado en términos de probabilidad (p).

7.2.11 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRIMERA ETAPA: Evaluación del Efecto de la Inmunidad Humoral Sobre la Transferencia y Expresión de los Genes Reporteros.

Durante la etapa inicial de nuestro programa de investigación se utilizó una población de 45 ratonas de la cepa Balb/c a las cuales se les provocó la aparición de tumores mediante la inyección de 1×10^6 células TM40-D. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de CO_2 utilizando medio D-MEM suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Cuando la confluencia celular fue cercana al 80%, las células en monocapa fueron lavadas con PBS y posteriormente tratadas con tripsina al 5%, después de un nuevo lavado y centrifugado, las células fueron contadas, resuspendidas en D-MEM y finalmente inyectadas en la región dorso-lateral de cada uno de los animales bajo estudio.

Después de un período de tumorigénesis de 4 semanas los animales fueron agrupados en 3 diferentes grupos de estudio e inmunizados de la manera siguiente:

El Primer grupo quedó conformado por 15 ratones inoculados por *vía subcutánea* con el vector adenoviral portador del gen reportero GFP. La cantidad de vector inoculada fue de 1×10^{11} VP en $20 \mu\text{l}$. El segundo grupo de estudio quedó integrado por 15 ratones inoculados con la misma dosis del vector pero por *vía intratumoral*, mientras que el grupo control no recibió adenovirus y sólo se le inyectó por *vía subcutánea* Tris-GVL buffer. Adicionalmente, se inyectaron 5 ratones inmunodeficientes RAG-2, los cuales fueron utilizados como segundos controles, ya que aunque recibieron la inyección de adenovirus, no tienen capacidad de generar anticuerpos. Ver la **Figura 15**.

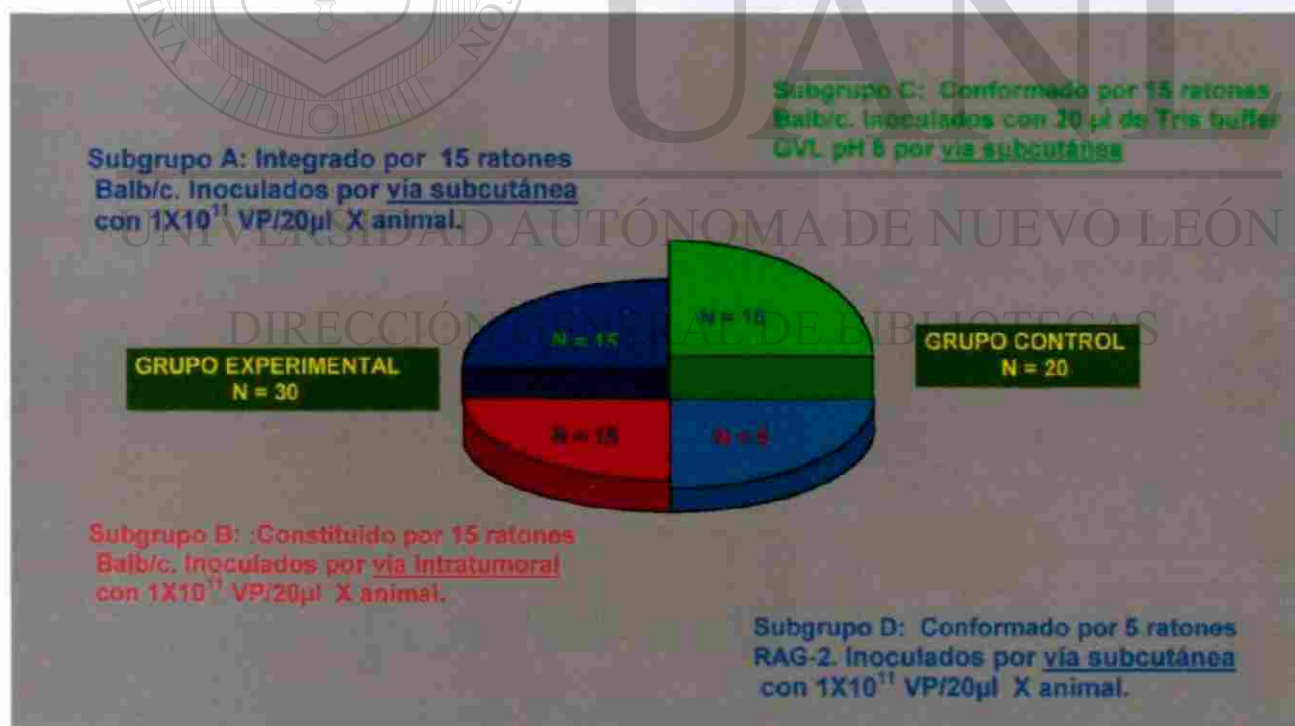


Figura 15. Diseño experimental de la primera etapa de investigación. La población en estudio quedó constituida por 50 ratones subdivididos en 4 grupos de estudio.

Dos semanas después de la inmunización (día 14), todos los animales fueron inoculados con un Segundo tipo de adenovirus portador de la secuencia codificante de luciferasa. La inyección se realizó directamente dentro del tejido tumoral a una dosificación de 1×10^{11} VP/20 μ l.

Dos, siete y catorce días después de la reinmunización (días 16, 21 y 28) se sacrificaron 5 animales de cada grupo. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ovario, piel y tumores. Todos los órganos extraídos fueron examinados inmediatamente y de manera directa por medio de un microscopio de inmunofluorescencia para efectuar un análisis cualitativo de los niveles de fluorescencia presentes en cada una de las muestras biológicas. Posteriormente, se realizó el ensayo de luciferasa con el propósito de determinar de manera cuantitativa los niveles de expresión de los genes reporteros

Antes, durante y al final del experimento se tomaron muestras de sangre de cada animal (días 0, 14, 16, 21 y 28) con la finalidad de establecer los niveles de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus; mediante los ensayos de ELISA y de anticuerpos neutralizantes. Los detalles metodológicos de la primera etapa de investigación son esquematizados en la **Figura 16**.

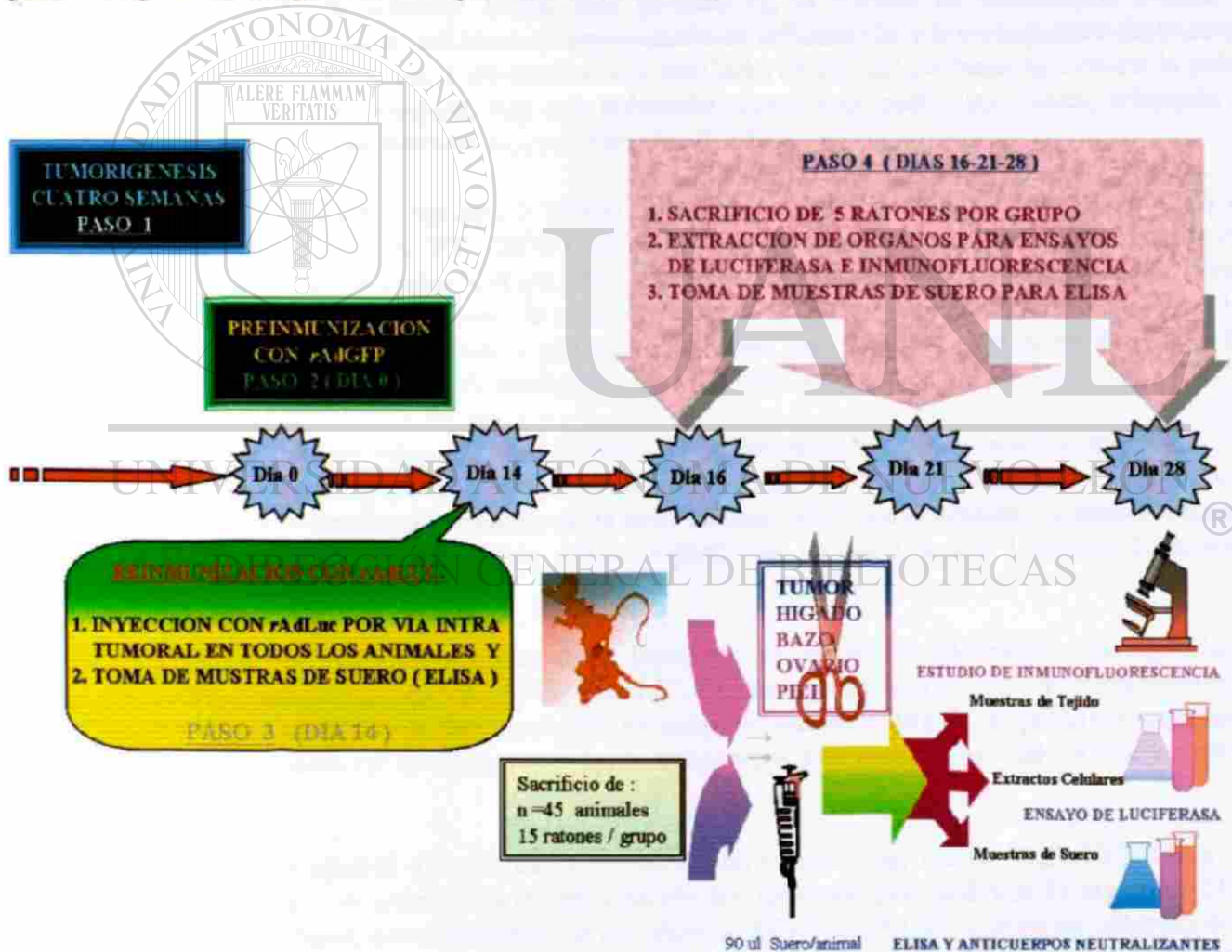


Figura 16. Estrategia general de la fase I. Representación esquemática del diseño experimental dirigido a evaluar el efecto de la inmunidad humoral sobre la expresión de los genes reporteros.

7.2.12 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA SEGUNDA ETAPA

El diseño experimental de la segunda etapa, se basa en una innovadora estrategia consistente en utilizar dosis crecientes (masivas) de vectores adenovirales en ratones pre-inmunizados, a los cuales se les ha inducido la generación de tumores mamarios de tipo heterotópico. Dos semanas después de la administración inicial del vector, los animales son reinoculados con un segundo tipo de adenovirus por medio de una inyección intratumoral. El propósito general de esta estrategia es determinar los efectos de la pre-inmunización sobre la transducción intratumoral y la diseminación sistémica de AdV-Luc, y dilucidar, si la utilización de dosis crecientes de vectores adenovirales en ratones con inmunidad pre-existente puede superar los efectos de la inmunidad local pero no los de la neutralización sistémica, restituyéndose así los niveles de expresión; sin la presentación de fenómenos de hepatotoxicidad o diseminación sistémica.

En este singular modelo biológico, la presencia de anticuerpos circulantes en contra de adenovirus pudiera impedir su diseminación más allá del sitio de inyección, circunscribiendo la expresión del transgen al micro-ambiente tumoral. Desde esta perspectiva, la barrera de anticuerpos evitará la infección de las células hepáticas, así como, la presentación de inflamación y la consiguiente destrucción de los hepatocitos por los linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, dentro del parénquima tumoral la pobre vascularización del tumor en conjunto con una población excesiva de partículas virales, rebasarán el umbral de la respuesta inmune montada en contra de adenovirus.

Dos diferentes tipos de adenovirus tipo 5 fueron utilizados durante esta etapa. Durante la etapa de preinmunización se utilizó el Adv-5 FT2M59 (AdV-FT2M59) construido bajo el control transcripcional del promotor del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) y carente de genes reporteros (gutless), este vector fue utilizado para inducir la producción de anticuerpos en el grupo de animales pre-inmunizados. Un segundo vector (AdV-Luc) que expresa el gen de la luciferasa bajo el control del promotor CMV fue utilizado durante la re-inmunización y/o administración de dosis crecientes de adenovirus.

Ambos vectores han sido descritos con anterioridad, fueron construidos con los métodos estándar.^{5,32,78} Su titulación fue determinada mediante espectrofotometría de absorción y la utilización de las técnicas de diluciones seriadas y de efecto citopático en la línea celular 293²⁸. La titulación de ambos vectores se ubicó en el rango de 9×10^{12} partículas virales (v.p/ml) con un radio de v.p/ Unidades Infecciosas menor de 20.

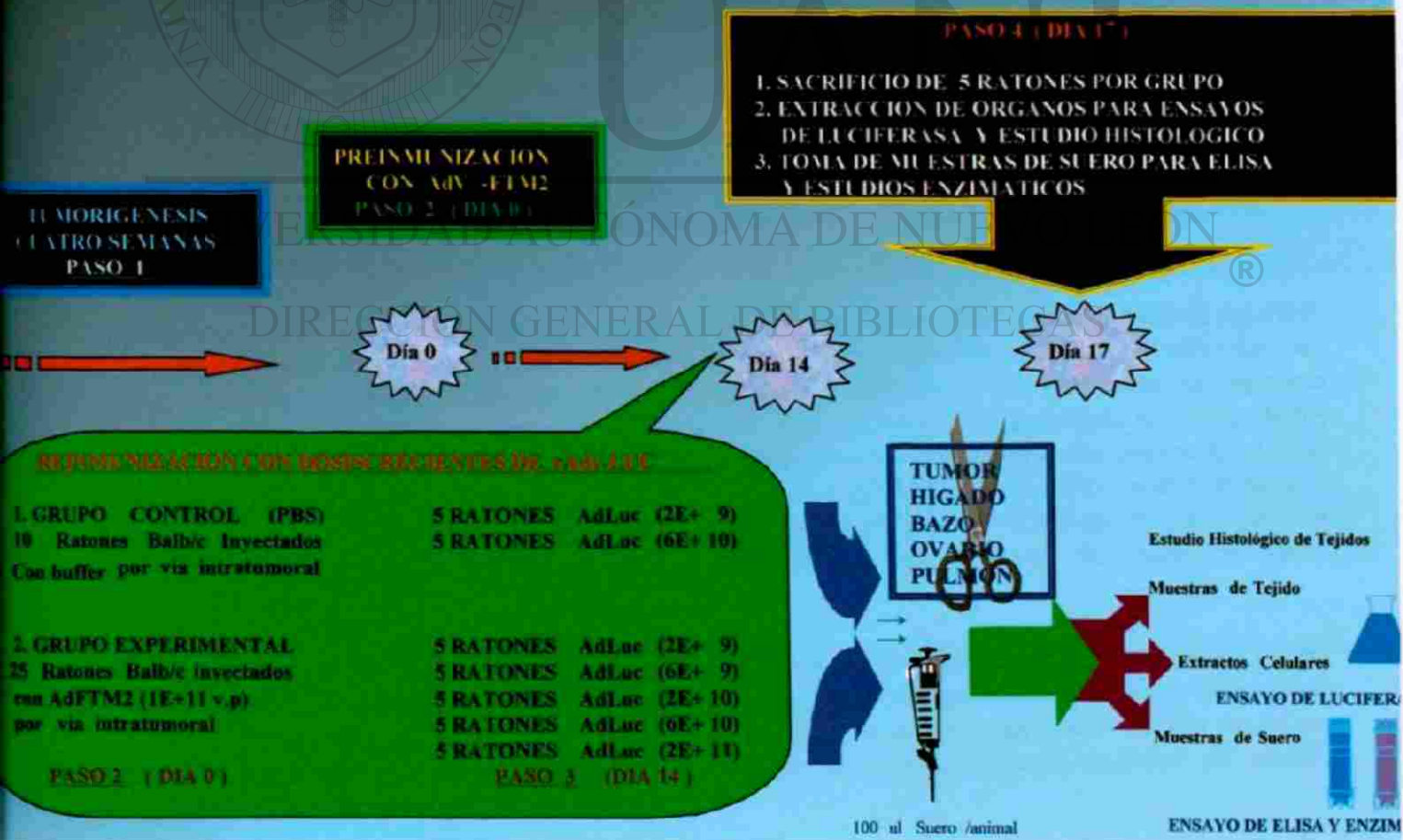
La preinmunización fue realizada a través de la inyección de un vector adenoviral con carencia de secuencias codificantes para genes reporteros "Gutless". La decisión de utilizar este vector se basa en la necesidad de evitar la aparición de fenómenos de inmunogenicidad en contra de las proteínas expresadas por los transgenes y garantizar que la generación de anticuerpos esté dirigida exclusivamente en contra de los antígenos virales.

La preinmunización se efectuó a través de la inyección intratumoral del vector AdV-FT2M59 a una dosis de 1×10^{11} v.p/ml por animal. La reinmunización fue realizada por medio de la inyección IT de AdV-Luc a dosis progresivamente crecientes en un rango de 2×10^9 a 2×10^{11} v.p/ en un volumen de 20 μ l/ tumor. Los aspectos metodológicos relacionados con el modelo tumoral, animales, ensayos in vitro, líneas celulares, recolección de tejidos, toma de muestras de suero, análisis enzimáticos, estudios histológicos y análisis estadístico han sido descritos previamente dentro del capítulo 7 de Material y Métodos.

El diseño experimental de la segunda etapa de investigación es semejante al de la primera y sus aspectos generales están detallados en la **figura 17**. Para este experimento se utilizó una población de 35 ratones Balb/c los cuales fueron divididos en 7 diferentes grupos de 5 ratones cada uno. Durante el día 0 del experimento, cinco grupos de animales recibieron pre-inmunización con AdV-FTM29, mientras que dos grupos fueron inyectados con solución de amortiguador de fosfatos (PBS) para constituir los 2 grupos control. En el día 14, todos los animales pre-inmunizados fueron inyectados por vía intratumoral con dosis crecientes de AdV-Luc como se explica a continuación: grupo 1: 2×10^9 , grupo 2: 6×10^9 , grupo 3: 2×10^{10} , grupo 4: 6×10^{10} , grupo 5: 2×10^{11} , v.p./20 μ l/tumor. Del mismo modo, durante el día 14, a los 2 grupos de animales controles se les inyectó con AdV-Luc a una dosis de 2×10^9 , y 6×10^{10} v.p./20 μ l/tumor.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

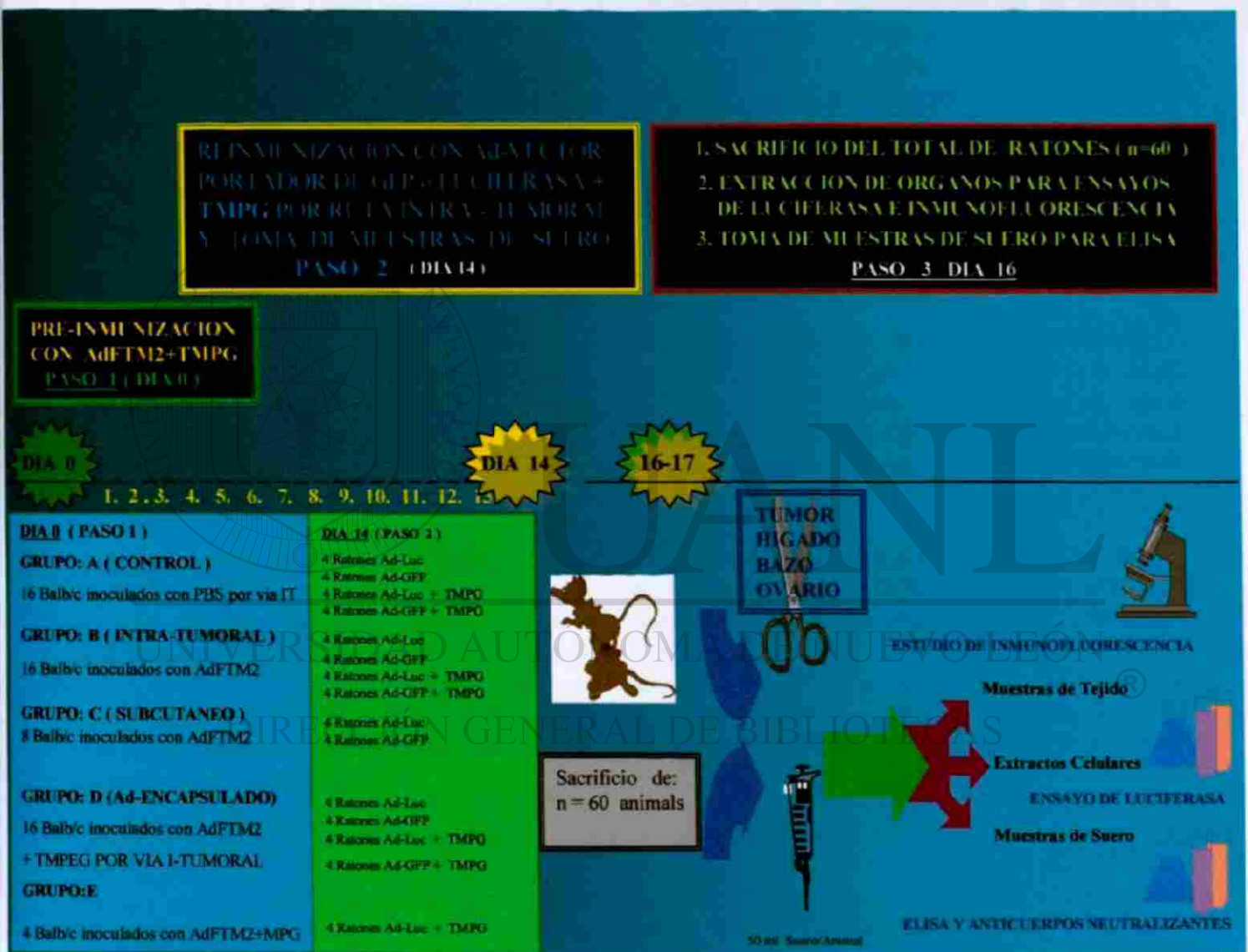


Figura 18. Estrategia general de la tercera etapa de investigación. Representación esquemática del método experimental dirigido a disminuir la inmunogenicidad de los vectores adenovirales a través de la encapsulación de la cápsida (PEGilación) con Polímeros de Polietilenglicol.

8. RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Grupo:	Ttulo (log ₂ /50ul)					Media	Dcv. Std.
	A	B	C	D	E		
Pre-Tx	<3	<3				<3	0
Control D-14	<3	<3	<3	<3	<3	<3	0.00
Intratum.D-14	5	4	7	5	5	5.2	1.10
Subcut. D-14	3	4	7	5	4	4.6	1.52
RAG-2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	0.00
Control D-16	<3	<3	<3	<3	<3	<3	0.00
Intratum.D-16	8	8	8	5	3	6.4	2.30
Subcut. D-16	4	8	8	8	8	7.2	1.79
Control D-21	7	7	7	4	8	6.6	1.52
Intratum.D-21	8	11	10	9	10	9.6	1.14
Subcut. D-21	10	10	9	9	10	9.6	0.55
Control D-28	4	4	5	6	6	5	1.00
Intratum.D-28	8	11				9.5	2.12
Subcut. D-28	7	8	8	7		7.5	0.58

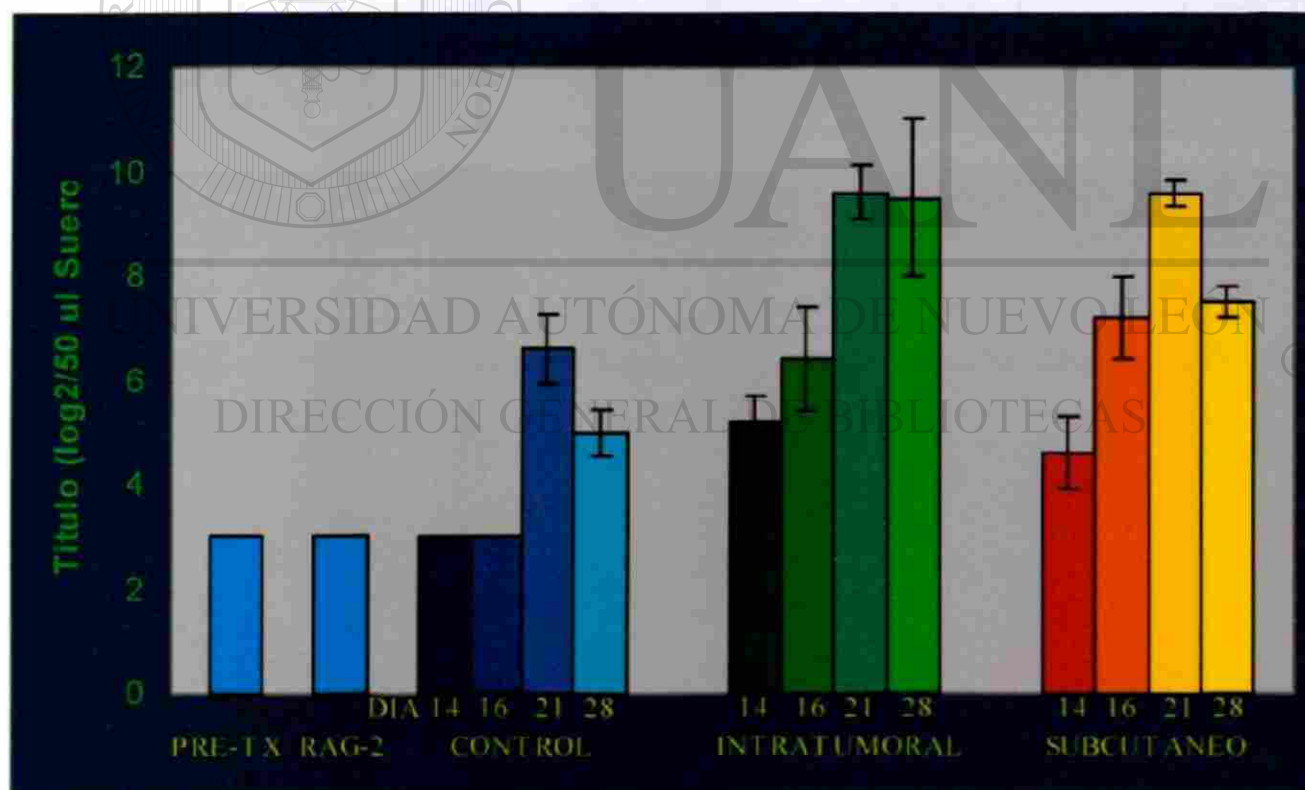


Figura 19. Gráfico de los títulos de anticuerpos contra rAdv-5 por ELISA. Nótese, que en los animales controles la producción de anticuerpos se eleva una semana después de la inyección inicial del vector. En los grupos de animales pre-inmunizados se aprecia una elevación en los títulos de anticuerpos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

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

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

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

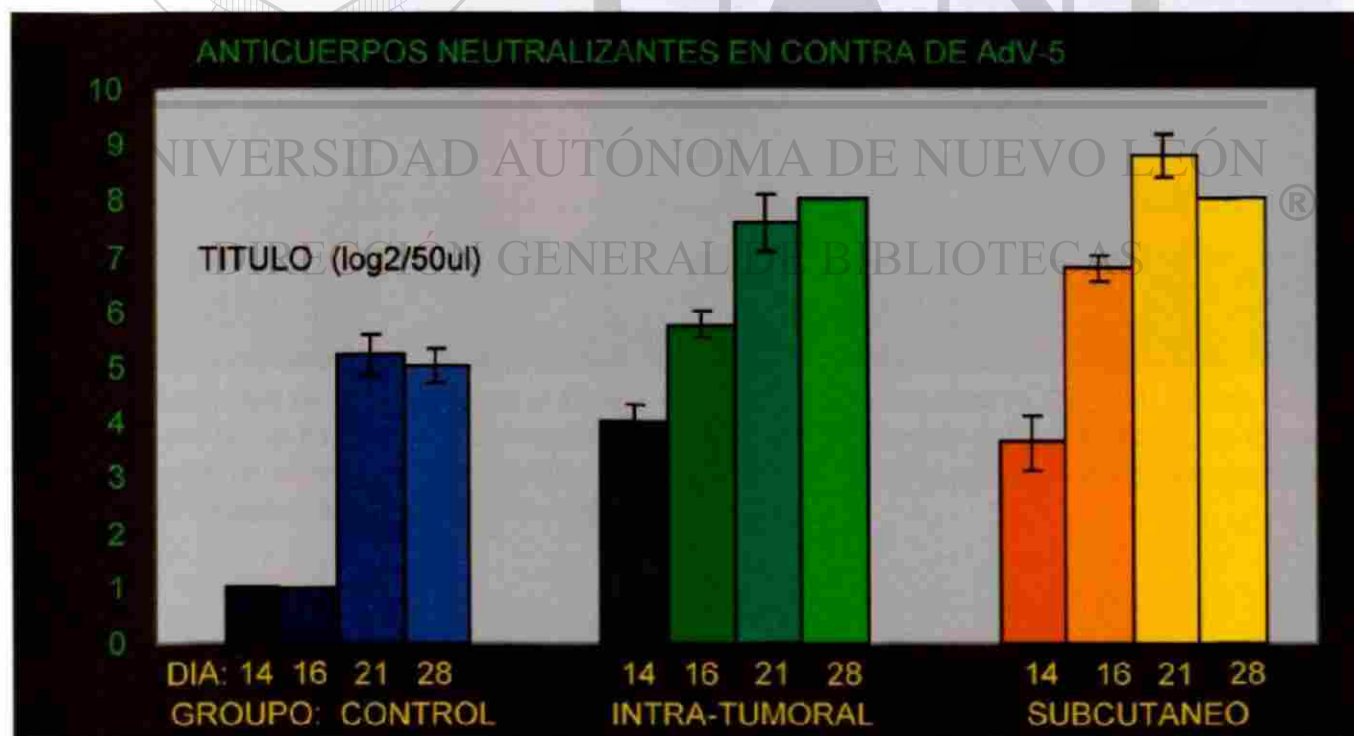


Figura 20. Gráfico de la actividad de neutralización de Adv-5. El título de neutralización se visualiza como un marcador subrogado de la habilidad del anticuerpo para prevenir la infección *in vivo*.

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

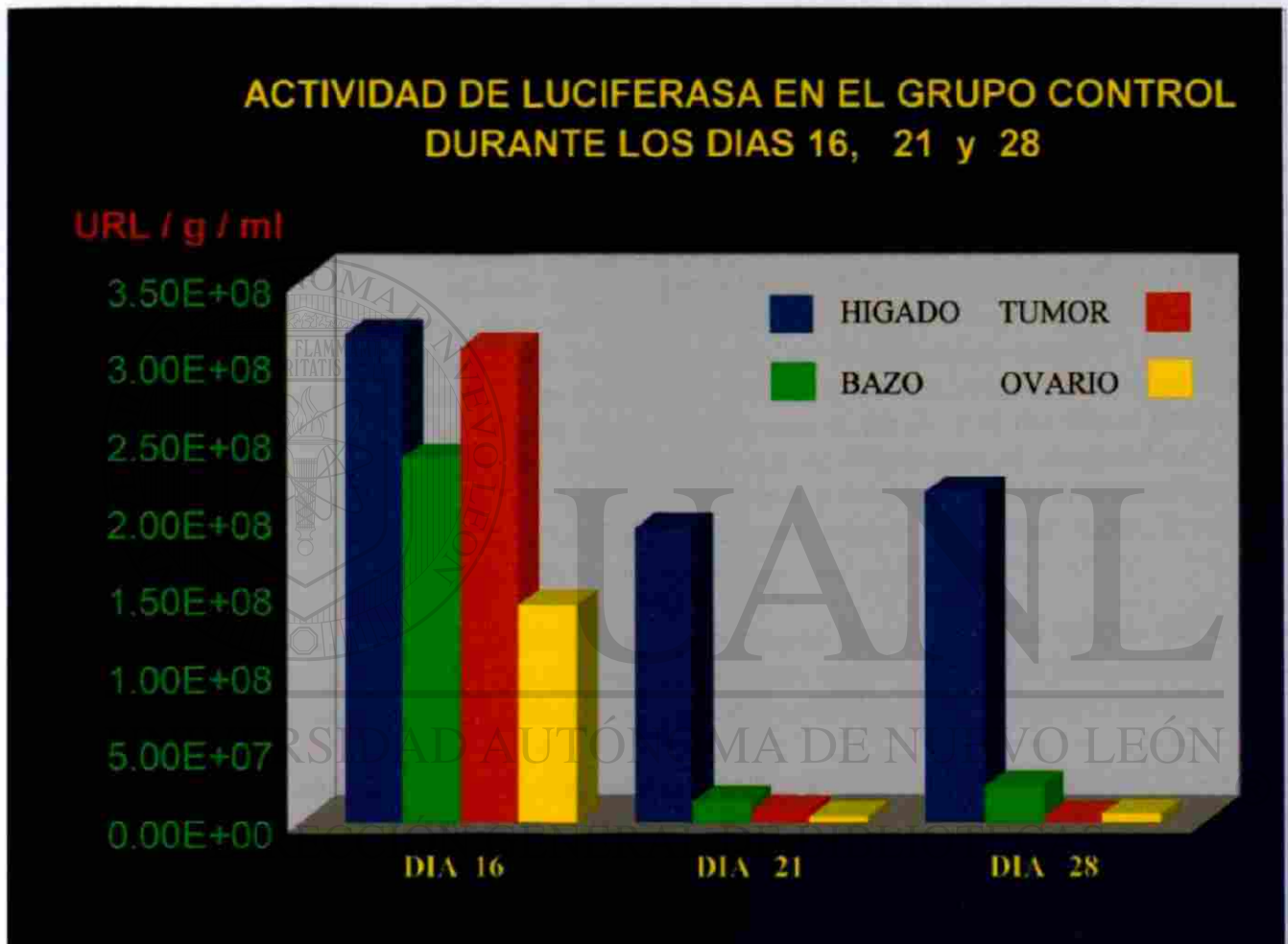


Figura 21. Actividad de Luciferasa en el Grupo Control durante los días 16, 21 y 28. Nótese que la actividad de luciferasa en los ratones normales es extremadamente elevada durante el día 21, ya que los animales carecen de anticuerpos que puedan obstaculizar la transferencia génica de los genes reporteros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

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

Por otro lado, en el grupo control, no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la expresión de Luc (en el día 16) entre tumor, hígado, bazo y ovarios, lo cual indica la diseminación sistémica del vector. Sin embargo, en los grupos de animales pre-inmunizados, la expresión de AdV-Luc, inyectado intratumoralmente, a nivel del propio tumor fue significativamente mayor comparada con la observada en el hígado (33 X,), bazo (131 X,) y ovario (55 X,). Ver las Figuras 21, 22 y 23.

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

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

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

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

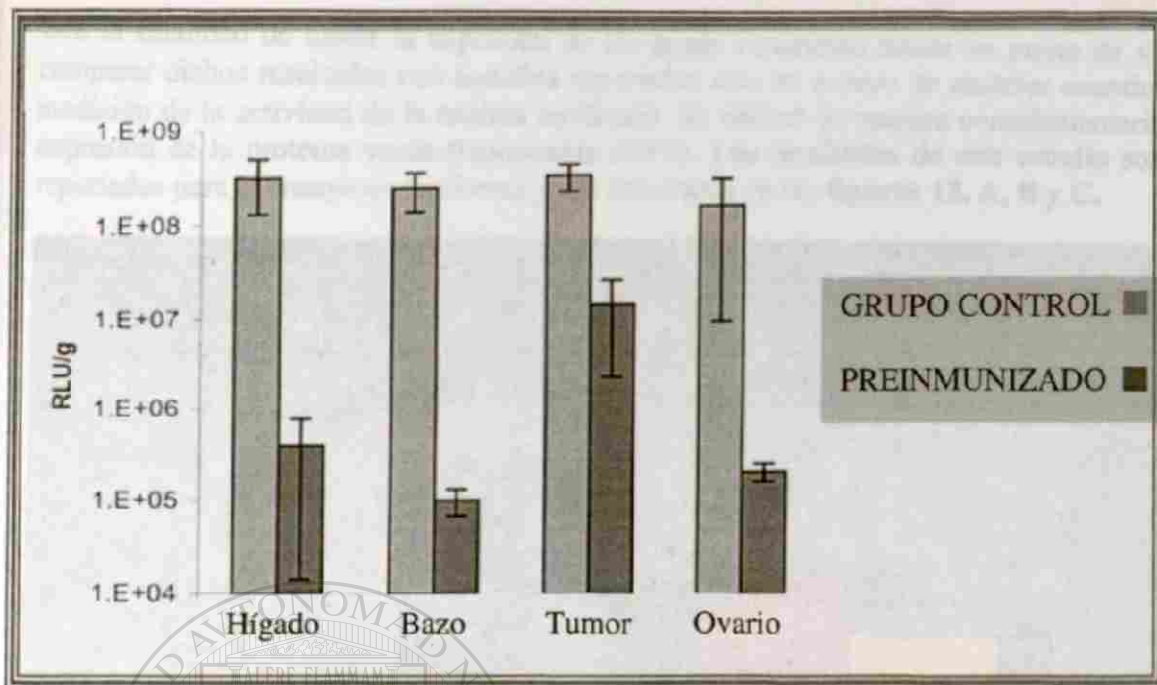


Figura 22. Actividad de luciferasa en ratones controles y preinmunizados expresada en RLU/g de tejido. Nótese su importante disminución dentro del tumor y en todos los órganos de los animales preinmunizados. Particularmente, la preinmunización limita la expresión de luciferasa en los tejidos Normales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

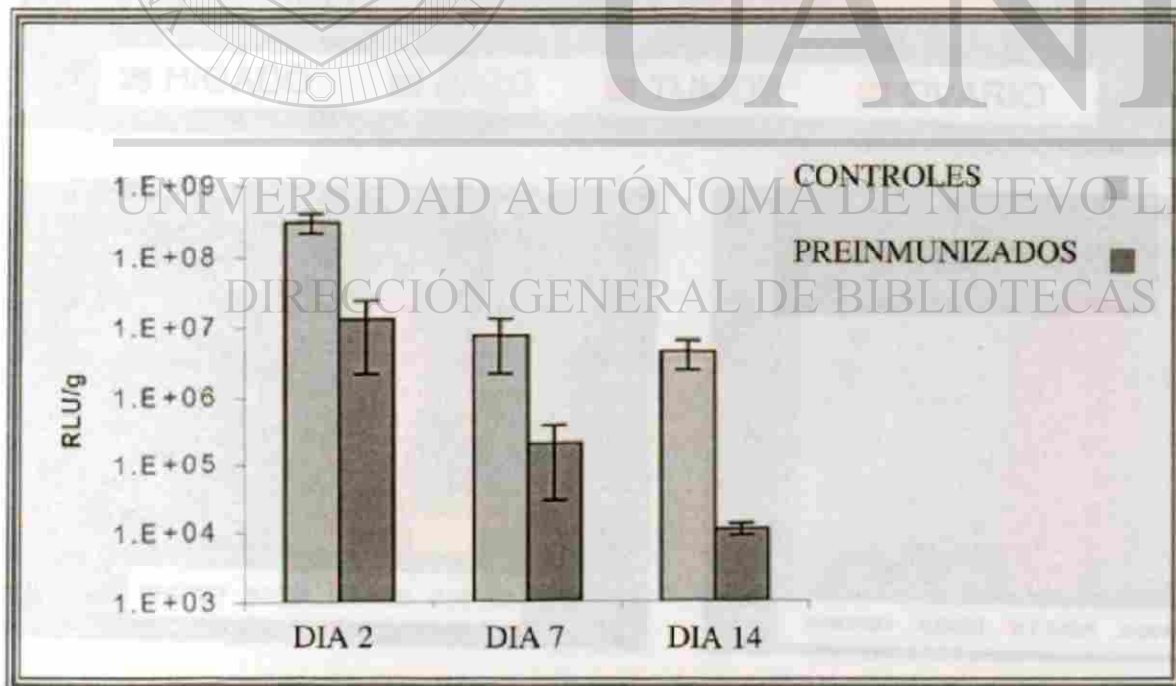
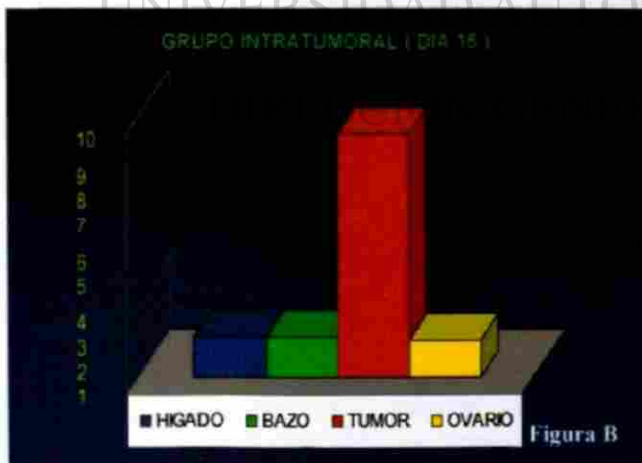
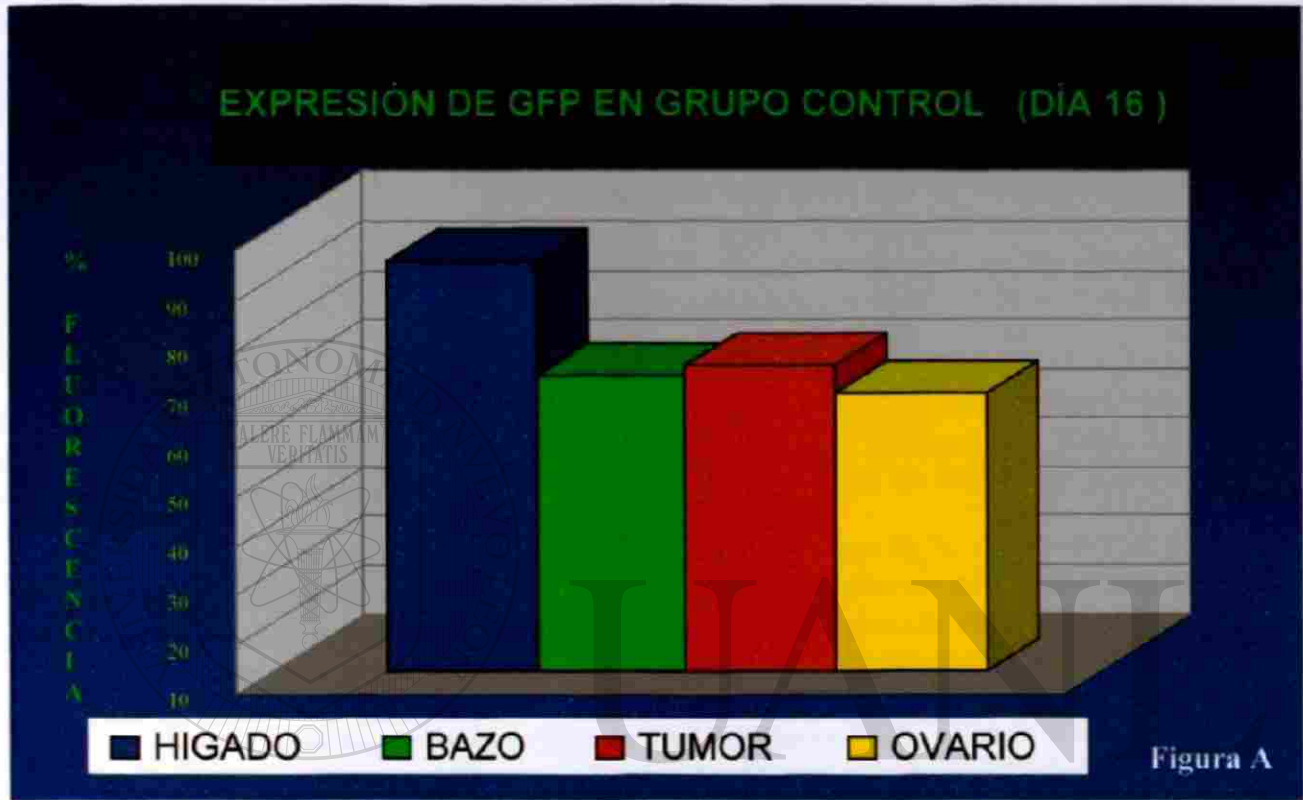


Figura 23. Expresión Intratumoral de Adv-Luc en Ratones Controles y Preinmunizados. Muestra como los niveles de luciferasa intratumoral se incrementan en el día 2 después de la inmunización y disminuyen durante el día 7 en ambos grupos. En controles, la Luc. IT esta consistentemente elevada en todos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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

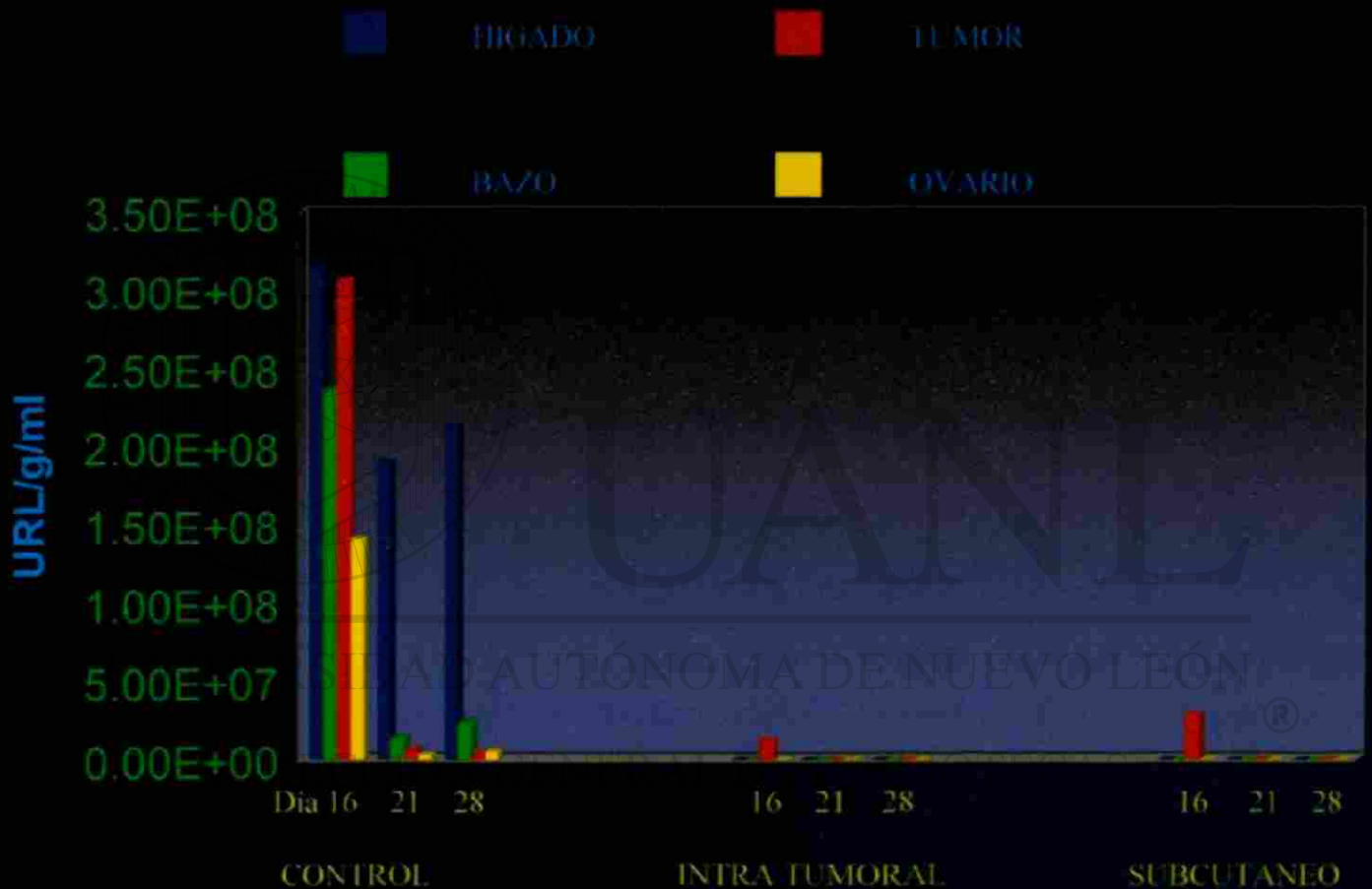


Figura. 24 Actividad de luciferasa en los tres grupos de estudio durante los días 16, 21, y 28. En el grupo de animales control se observa un incremento significativo en los promedios de expresión de Adv-Luc durante todos los tiempos de estudio. En el grupo de animales preinmunizados se aprecia una significativa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

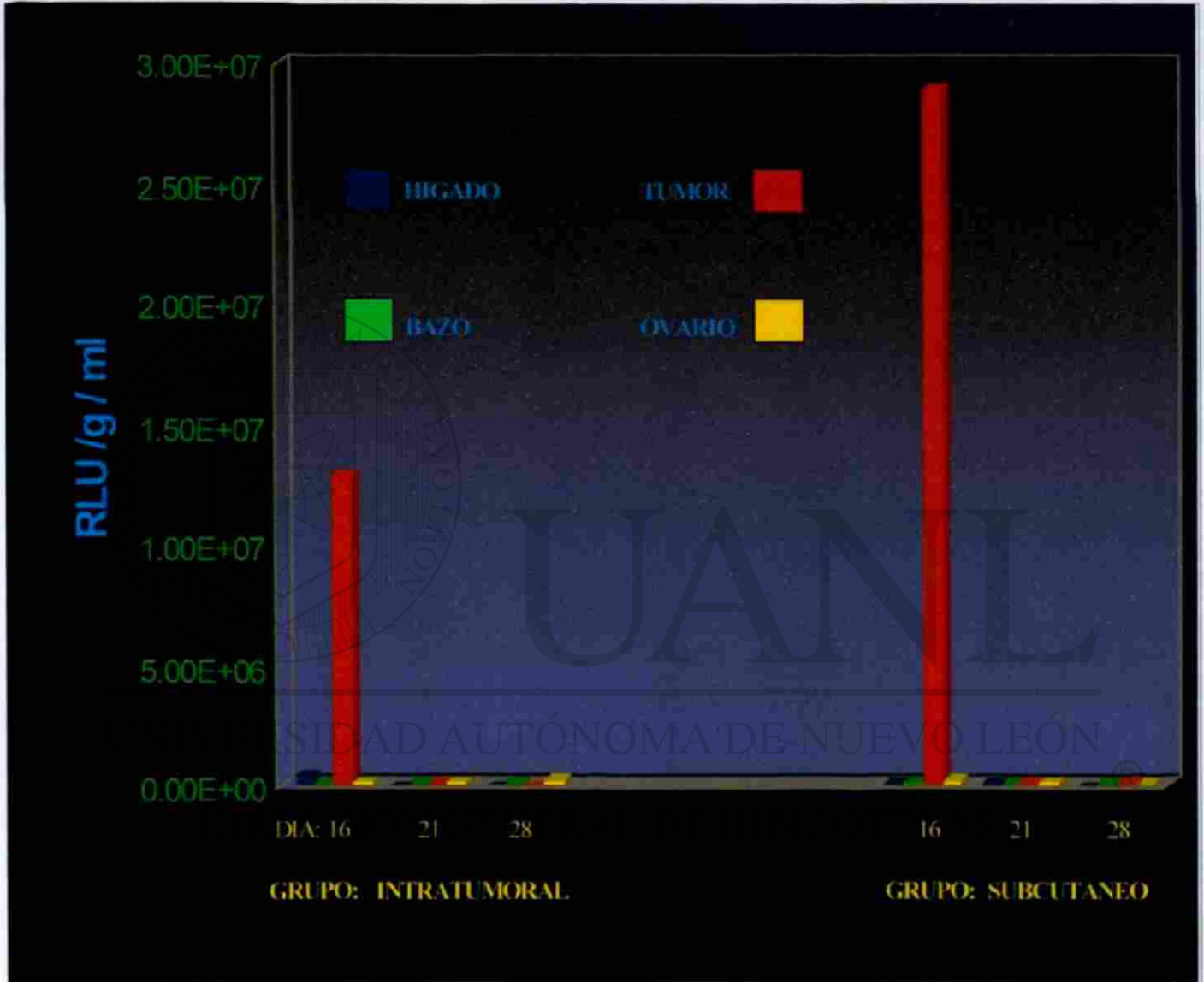


Figura 25. Actividad de luciferasa en los grupos inmunizados por vía subcutánea e intratumoral durante los Días 16, 21 y 28. En animales pre-inmunizados se observa una significativa reducción en el nivel y duración de la expresión de luciferasa. Esta disminución es más importante en el hígado, comparada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

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

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

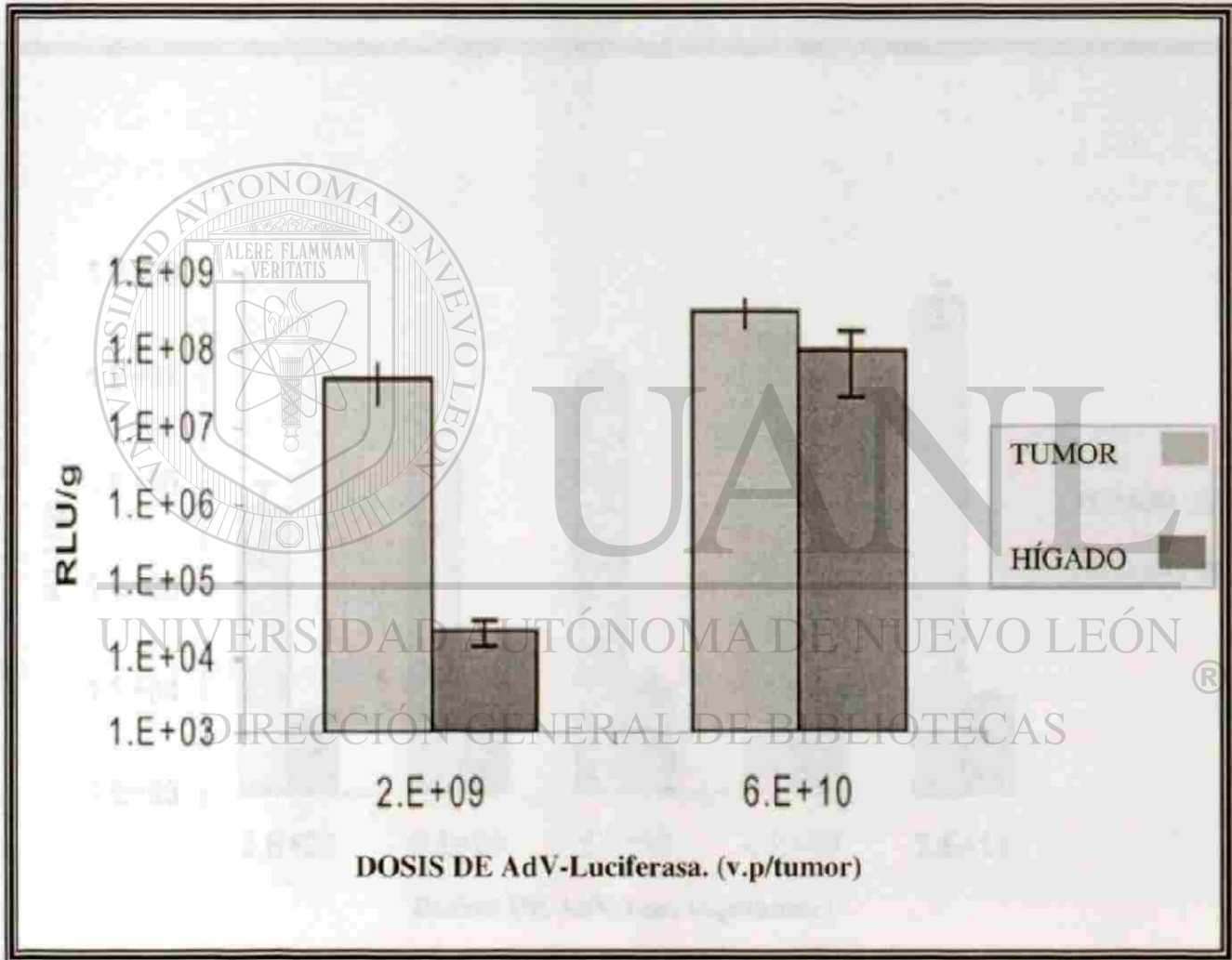


Figura 26. Expresión de Adv-Luc en animales control como una función de la dosis de adenovirus. En animales control se aprecia un incremento de 4000 X en la expresión de luciferasa hepática, cuando se incrementa la dosis de 2×10^9 to 6×10^{10} v.p./tumor ($p=0.000$), mientras que la expresión de Adv-Luc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

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

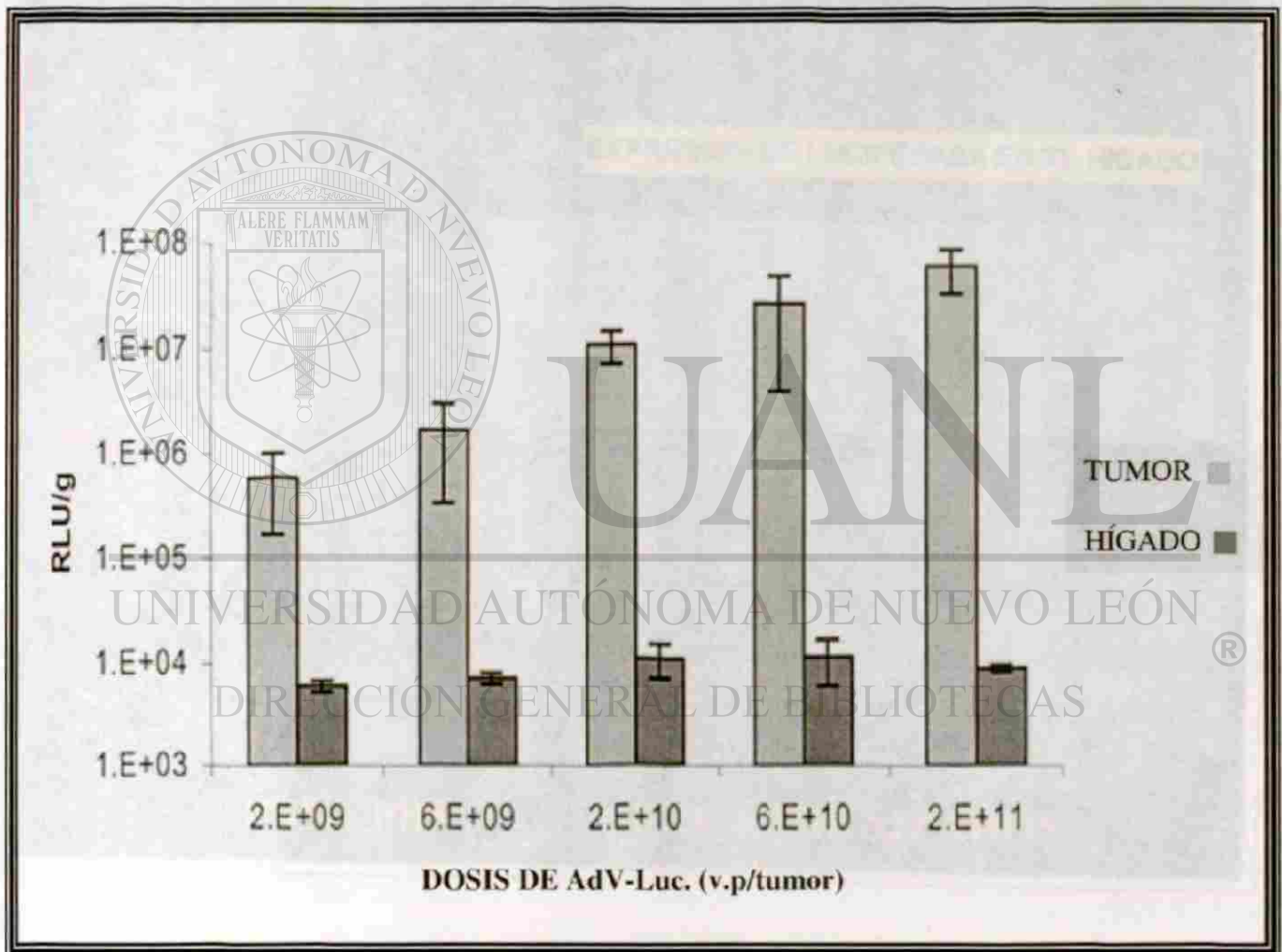


Figura 27. Expresión de Adv-Luciferasa en animales pre-inmunizados como una función dependiente de la dosis. En animales pre-inmunizados el uso de dosis crecientes de AdV-Luciferasa no incrementan la expresión de Luciferasa a nivel hepático. Sin embargo, la actividad de la enzima a nivel tumoral es directamente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

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

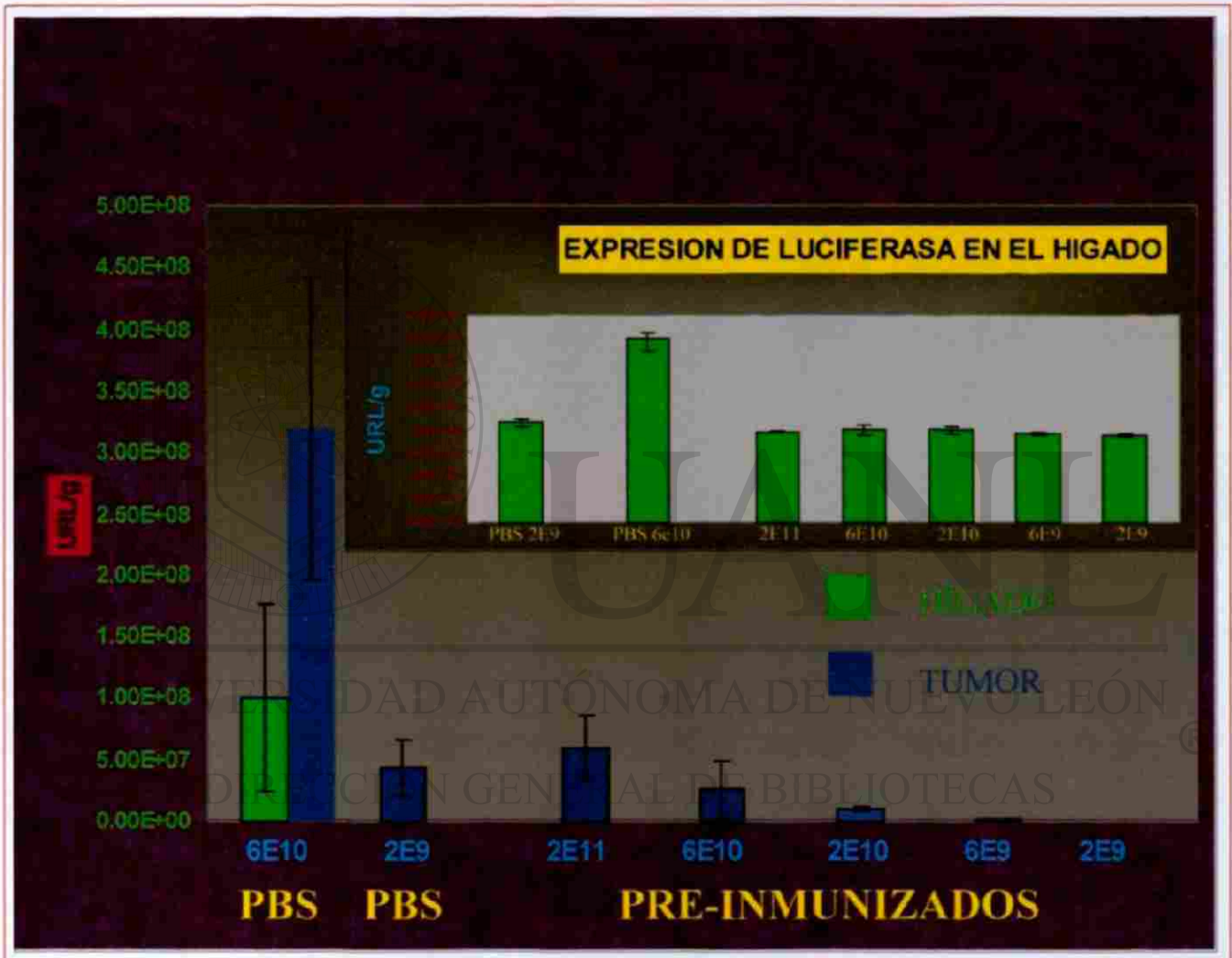


Figura 28. Expresión de luciferasa en animales preinmunizados e inoculados con dosis crecientes de AdV/Luc. El uso de dosis crecientes de Adv-Luc en ratones normales no inmunizados se traduce en una mayor expresión del transgen a nivel hepático cuando se incrementa la dosis. Mientras que en los animales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

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

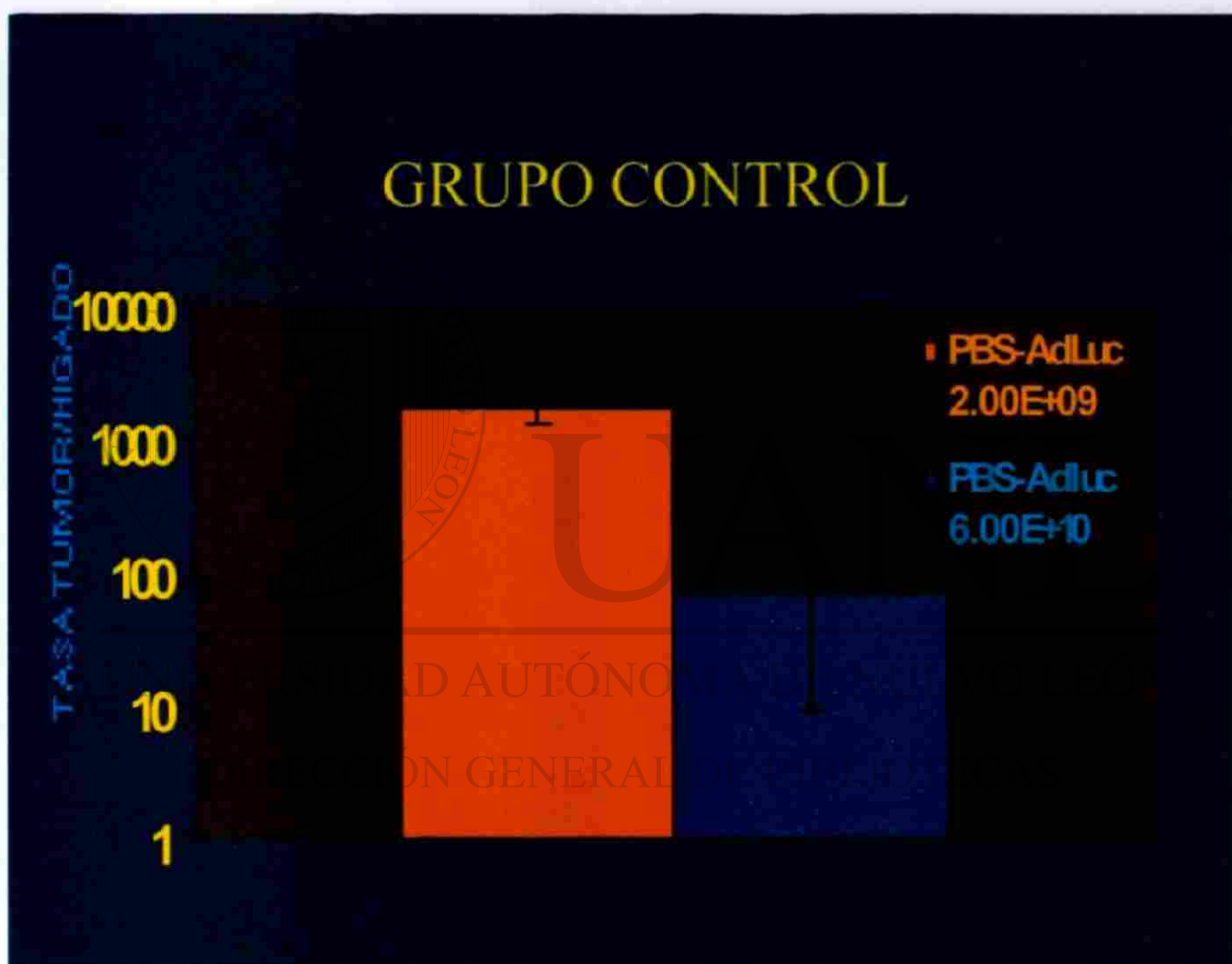


Figure 29. Tasa tumor-hígado en el grupo de ratones control. La tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc en ratones control fue inversamente proporcional a la dosis del vector que se inyectó dentro del tumor ($p=0.002$). Los resultados muestran una actividad de luciferasa desproporcionadamente alta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

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

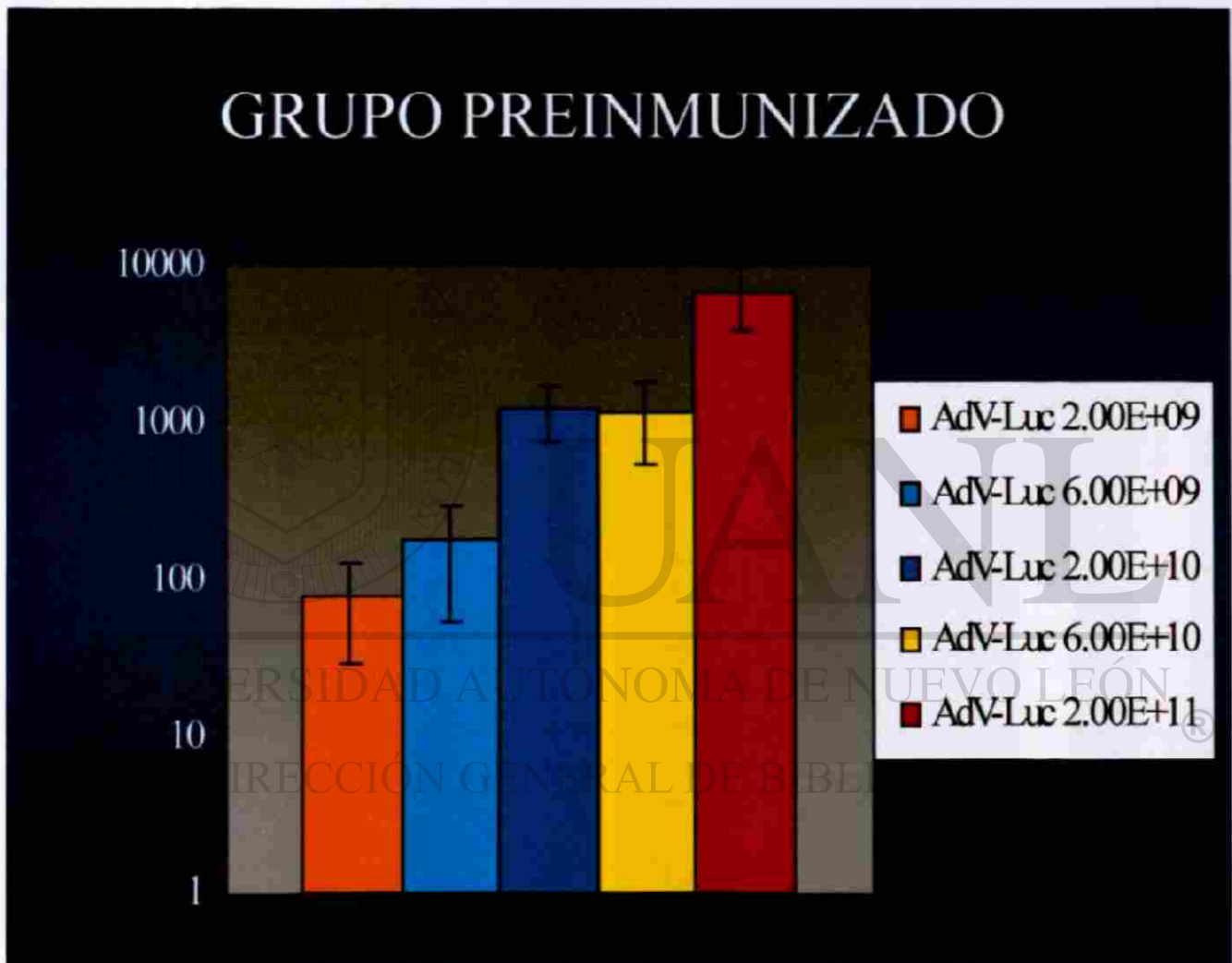


Figura 30. Tasa tumor-hígado en el grupo de ratones preinmunizados e inoculados con dosis crecientes de AdV/Luc. En los animales pre-inmunizados la tasa tumor/hígado de expresión de AdV-Luc fue directa y proporcional con la cantidad del vector administrada ($p<0.003$). Los resultados sugieren que la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

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

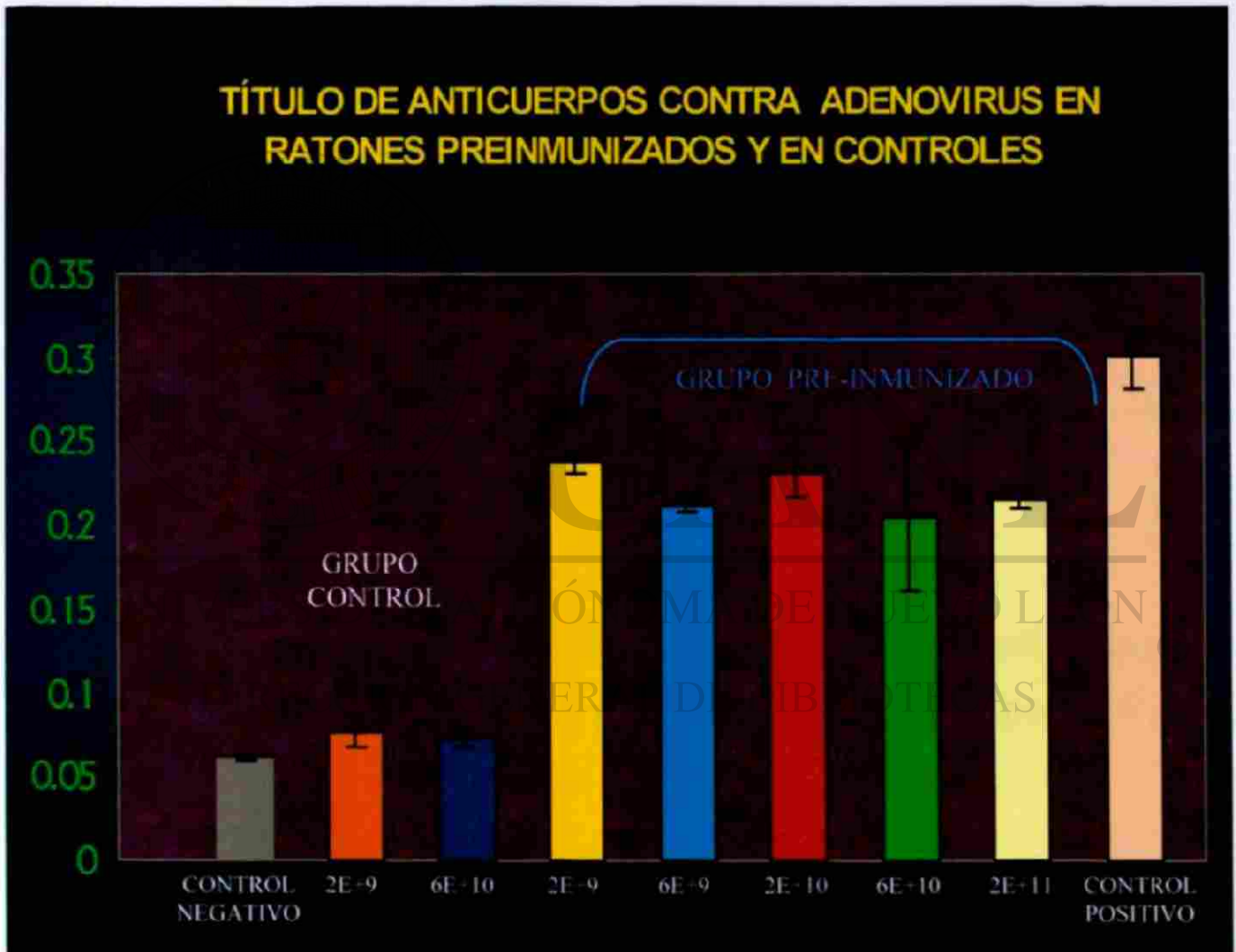


Figura 31. Títulos de anticuerpos analizados como una función de la dosis de AdV/Luc, tanto en animales pre-inmunizados como en controles. Dos días después de la reinmunización de AdV/Luc se observó un incremento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales preinmunizados en comparación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

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

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

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

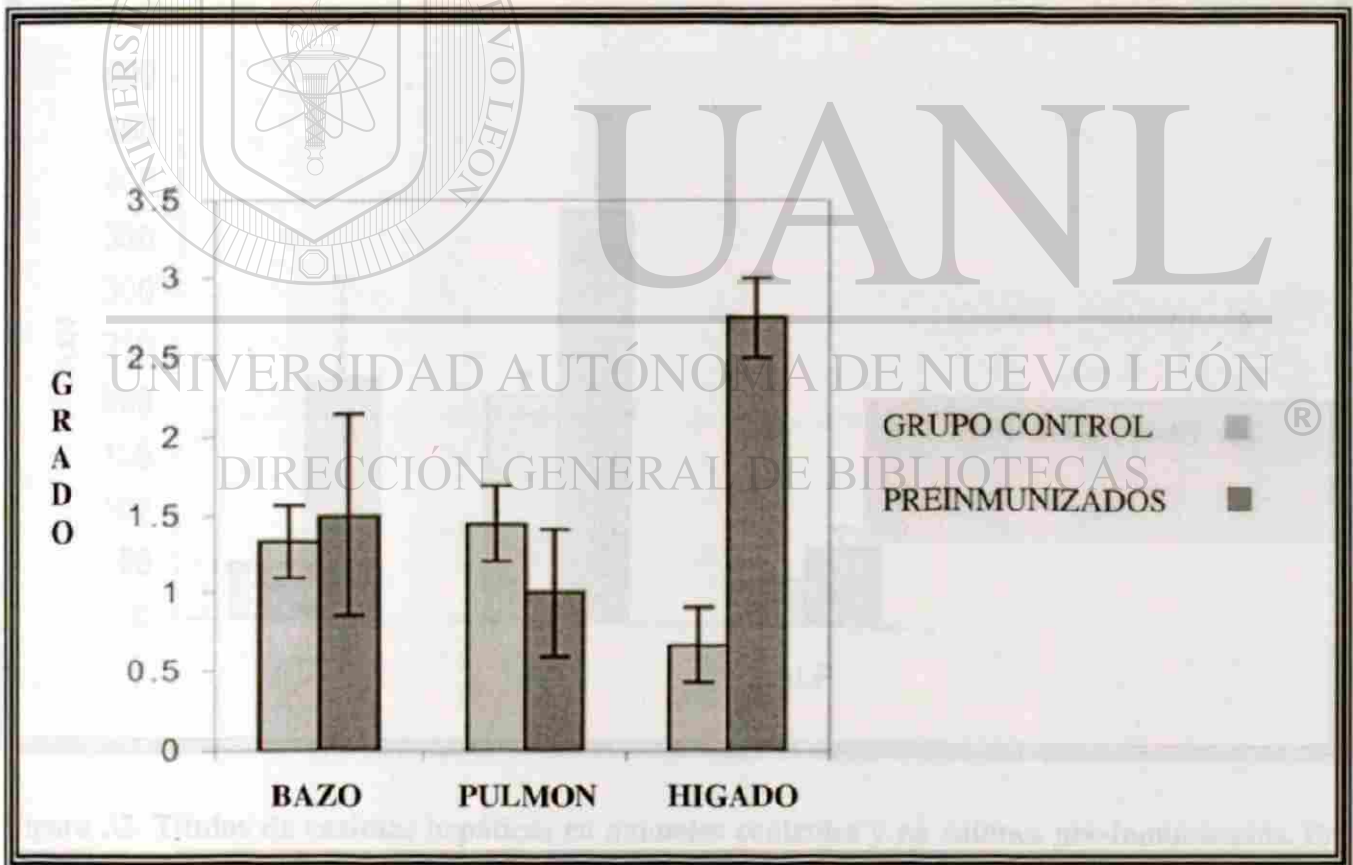


Figura 32. Citotoxicidad de Adv-Luc sobre tejidos normales en animales controles y preinmunizados. La evaluación histológica en tejidos normales recolectados 3 días después de la administración de AdV-Luciferasa, mostró un índice elevado de hepatitis en el grupo de ratones preinmunizados, mientras que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

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

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

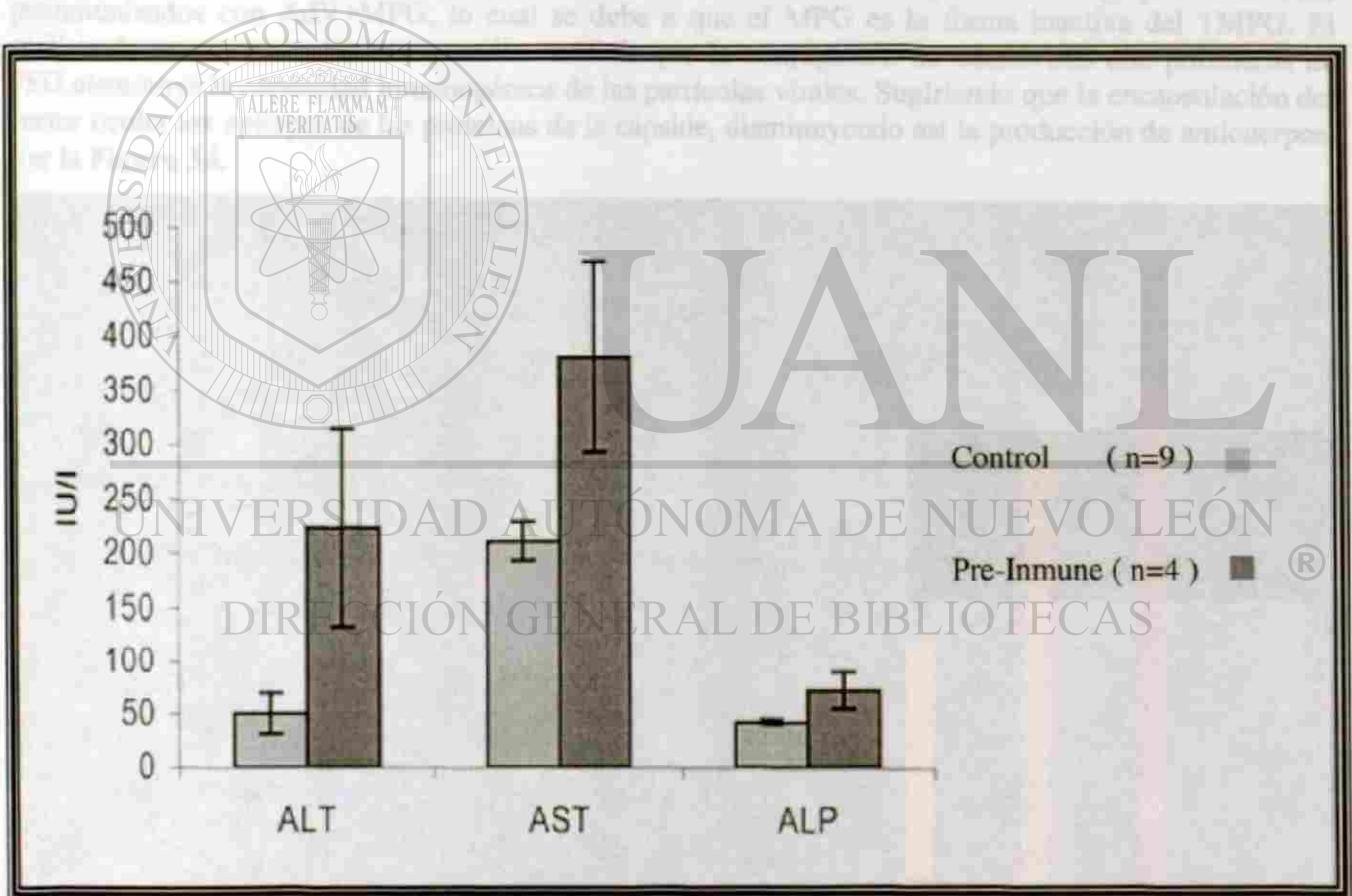


Figura 33. Títulos de enzimas hepáticas en animales controles y en ratones pre-inmunizados. En animales preinmunizados se observa un incremento en los promedios de enzimas hepáticas al compararlo con controles. Particularmente de la enzima Alanin-amino transferasa (de 50.78 Ui/l +/- 58.28 DE a 224 Ui/l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

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

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

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

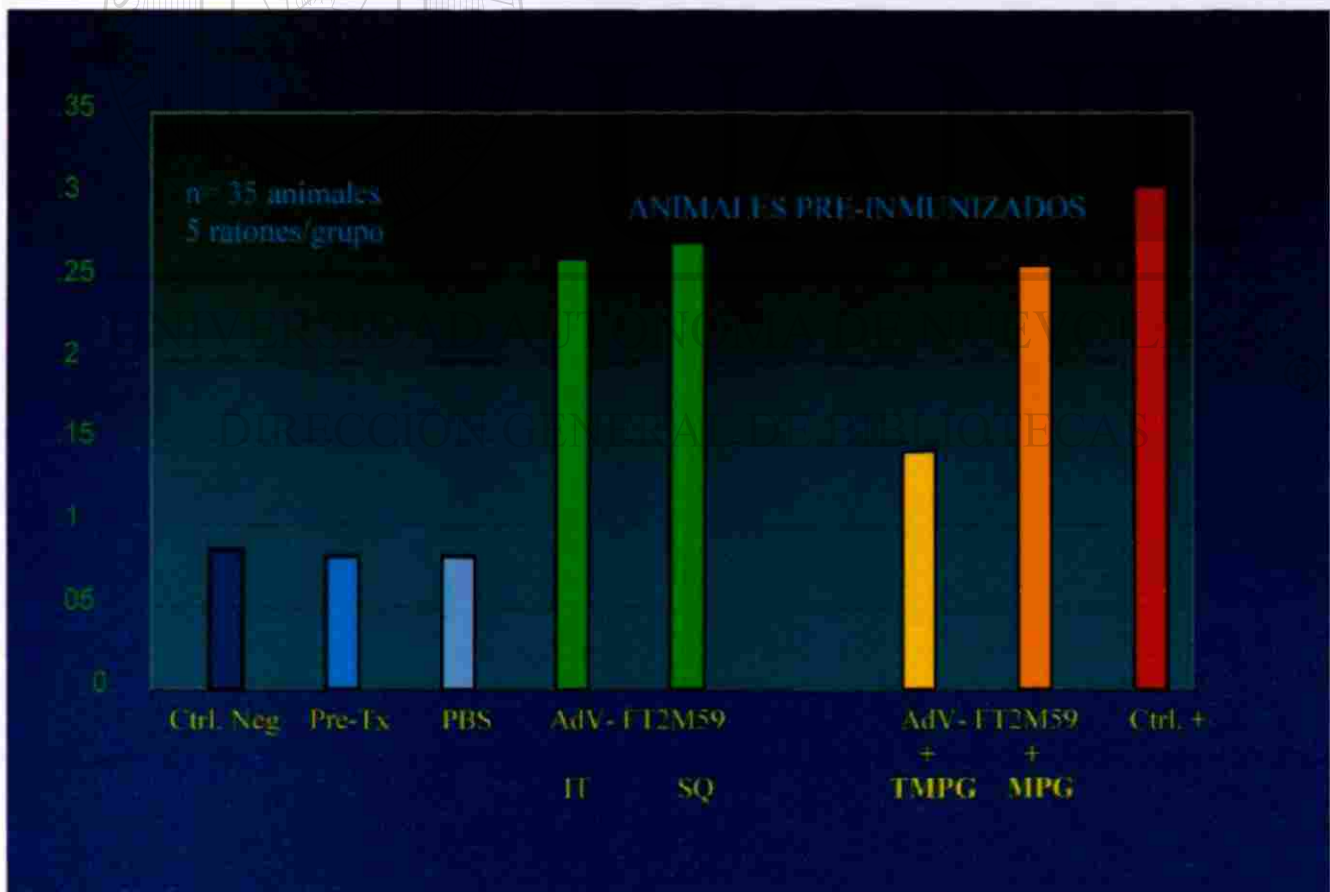


Figura 34. Titulación de anticuerpos en contra de adenovirus encapsulados con polímeros de polietilenglicol.

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

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

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

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

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



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

9. DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otros factores que pueden limitar la expresión del transgen son el desarrollo de anticuerpos en contra de las proteínas codificadas por el transgen (luciferasa), la cantidad de partículas virales administradas, el promotor escogido para dirigir la expresión del gen recombinante y la citotoxicidad directa causada por el vector y/o la expresión de las proteínas virales.^{2,8f}

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

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

1. En ratones inmunodeficientes por bloqueo en la maduración de los linfocitos T y B, la expresión de transgenes codificados dentro de adenovirus se extiende hasta 4 meses después de la postinfección.⁸⁸ 2. En ratones inmunodeficientes Rag-2 infectados con adenovirus, la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺ y CD4⁺) procedentes de ratones normales infectados con adenovirus, provoca la eliminación del vector y el correspondiente transgen a los pocos días después de la transfusión.⁸⁰ 3. En ratones inmunocompetentes la supresión de las células CD8⁺ o CD4⁺ se traduce en una elevada y persistente expresión del transgen⁸⁰.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten concluir las siguientes aseveraciones:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

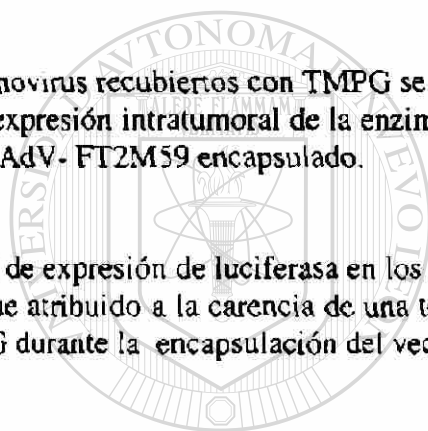
*El uso de dosis elevadas de vectores virales en animales con inmunidad pre-existente, restituye los niveles de expresión intratumoral a niveles comparables con los observados en animales controles.

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

11. BIBLIOGRAFÍA

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

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

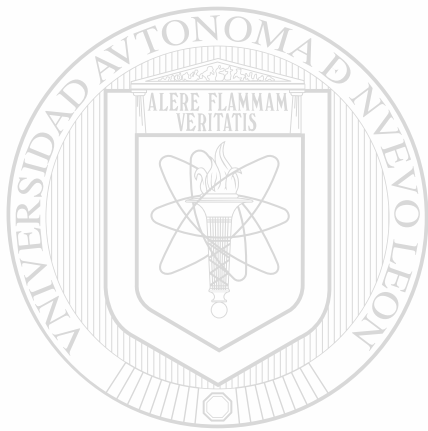
28. Graham, F., y A. J. Van der Eb. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467
29. Graham FL, Smiley J, Russel WC y Nairn R (1997): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-72.
30.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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



