

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTOS TOXICOLOGICOS DE VECTORES
ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA

Por

ESTHER MAGDALENA MARQUEZ LONA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

2003

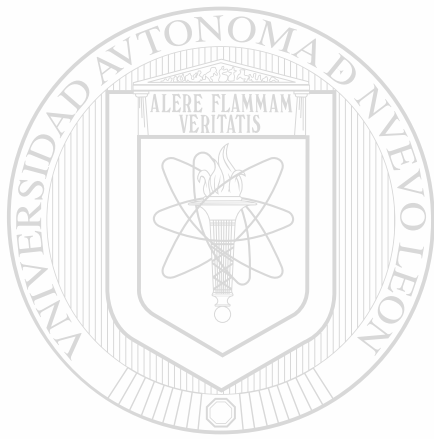
TM

QR396

.M3

c.1

ESPIHER ALFENA MARQUES LONNA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS
DE RATA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

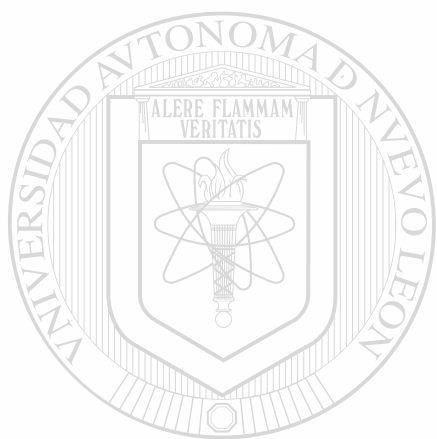
ESTHER MAGDALENA MÁRQUEZ LONA

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

2003



TM
QR396
.M3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

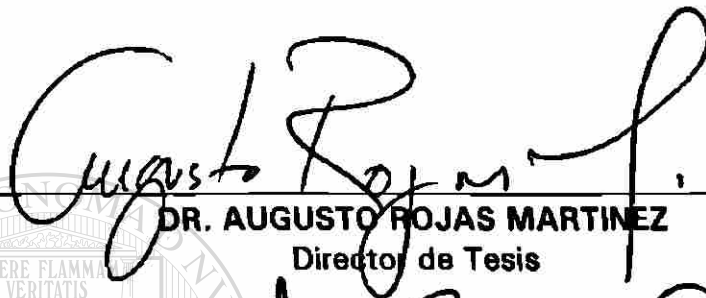
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**EFFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES
EN FETOS DE RATA**

Aprobación de la Tesis:



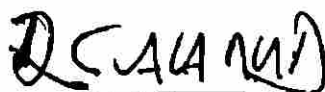
DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis



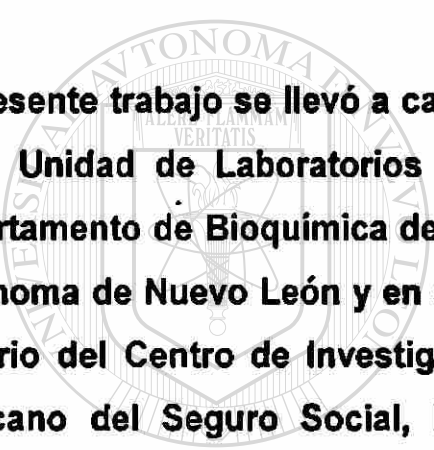
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



MVZ. M.C. HECTOR GERARDO LOZANO GARZA
Miembro de la Comisión de Tesis



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



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular de 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 y en el Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y bajo la co-asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y el M en C. Héctor Gerardo Lozano Garza.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud al Dr. Augusto Rojas Martínez por su confianza en el desarrollo de este nuevo proyecto en un área desconocida y fascinante. Por su paciencia, tutoría y sobre todo por la calidad humana y el respeto.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Hugo Barrera Saldaña por haberme permitido el ingresar al programa de postgrado, por su asesoría y guía.

Al Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, por permitir el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Gerardo Lozano Garza por la confianza, la amistad y sobre todo el apoyo incondicional a todo lo largo de este proyecto.

A la Clínica No.34 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en especial al Dr. Jesús Ojeda Ibarra por todo el apoyo y excelentes consejos, así como todo el excepcional análisis patológico realizado para esta tesis.

Al Departamento de Bioquímica y en especial a la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A mis padres por todo el amor y el apoyo incondicional. A mis hermanos por ser los mejores del mundo.

A todos y cada uno de mis familiares por sus porras y consejos.

A mis amigos de Guanajuato, Monterrey y de la UCI, por tanto cariño y por todas las parrandas.

A DIOS, por la oportunidad de vivir y ser bendecida con la amistad y el amor.

A ti mi abuelo, siempre en mi corazón.

I have a dream.

RESUMEN

Esther Magdalena Márquez Lona

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Agosto del 2003.

Área de Estudio: Terapia Génica.

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

Número de páginas: 89.

Título del Estudio: "EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA".

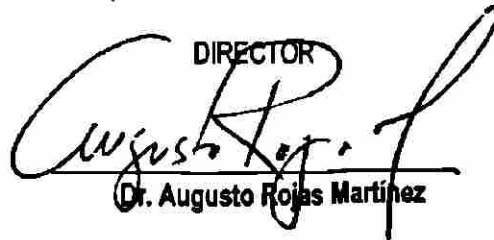
Objetivo: El presente trabajo es un proyecto de investigación pre-clínica sobre los efectos tóxicos de la terapia génica intrauterina, en el cual se investigaron los posibles efectos toxicológicos de vectores adenovirales en productos y madres de la especie *Ratus norvegicus* transducidos por la vía sistémica materna (inyección endovenosa) y por la vía intra-amniótica, durante estadios tardíos del proceso de embriogénesis.

Material y Métodos: Después de la determinación citológica de la copulación, grupos experimentales de ratas madre fueron transducidas con el vector adenoviral AdV-CMV- β gal (vector basado en el serotipo 5 humano), el cual codifica para la enzima bacteriana β -galactosidasa. Las ratas y productos del grupo control recibieron solución salina. Las transducciones con vector (o el tratamiento con solución salina en los controles) se realizaron a los 12 y 15 días post-coito (d.p.c.). Las transducciones se hicieron por dos vías: 1) en la ruta sistémica, las ratas recibieron una dosis endovenosa (i.v., inyección en vena de la cola) de 1×10^{11} partículas de vector (p.v.) y el grupo control recibió solución salina. Para la transducción por la vía intra-amniótica (i.a.), las madres fueron sometidas a laparotomía y la mitad de los productos fueron transducidos con una dosis de 1×10^{10} p.v., mientras que los productos restantes (controles) fueron transducidos con un volumen similar de solución salina. Las madres fueron sacrificadas al 19 d.p.c. para determinar la transducción de órganos maternos y fetales mediante la tinción para X-gal y determinar lesiones malformativas, tóxicas o inflamatorias.

Resultados: En todos los fetos analizados el intestino fue el órgano más transducido (++++), siendo también positivos el cordón umbilical y el amnios. Los fetos transducidos vía i.a. también mostraron transducción en retroperitoneo (+++), pulmón (+++), glándulas suprarrenales (++) y piel (+). Los embriones a estadios medios de gestación manifestaron una sensibilidad extrema a la administración i.a. del vector y a las cargas virales altas, registrándose muerte in-útero hasta en un 70% a 12 d.p.c. En ambas rutas de administración se observó en las madres positividad para β -galactosidasa en hígado, riñón, bazo, cuernos uterinos, etc., destacándose la observación de transducción en encéfalo por las dos vías ensayadas y de ovarios en la ruta i.a. Adicionalmente, en las madres pudo establecerse el desarrollo de una respuesta inmune moderada (+), con presencia de macrófagos y linfocitos, sin el desarrollo de alteraciones morfológicas, ni procesos patológicos en los órganos estudiados. La manipulación a 12 d.p.c. se asoció a alto índice de mortalidad materna (25%).

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció que a las dosis y estadios probados no existe una relación directa entre malformación y transducción adenoviral en productos expuestos aún en embriogénesis activa. Se evidenció la transducción adenoviral en varios órganos fetales (cordón umbilical, amnios e intestino por vía i.v. y cordón umbilical, amnios, intestino, retroperitoneo, pulmón, piel y glándulas suprarrenales por vía i.a.) y transducción por ambas vías en varios órganos maternos (cuernos uterinos, riñón, hígado, pulmón y bazo), resaltándose la transducción del encéfalo (ambas vías) y de ovarios (vía intra-amniótica).

DIRECTOR



Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-DIRECTOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CO-DIRECTOR



MC. Héctor Gerardo Lozano Garza

RESUMEN

Esther Magdalena Márquez Lona

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Agosto del 2003.

Área de Estudio: Terapia Génica.

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

Número de páginas: 89.

Título del Estudio: "EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE VECTORES ADENOVIRALES EN FETOS DE RATA".

Objetivo: El presente trabajo es un proyecto de investigación pre-clínica sobre los efectos tóxicos de la terapia génica intrauterina, en el cual se investigaron los posibles efectos toxicológicos de vectores adenovirales en productos y madres de la especie *Ratus norvegicus* transducidos por la vía sistémica materna (inyección endovenosa) y por la vía intra-amniótica, durante estadios tardíos del proceso de embriogénesis.

Material y Métodos: Después de la determinación citológica de la copulación, grupos experimentales de ratas madre fueron transducidas con el vector adenoviral AdV-CMV- β gal (vector basado en el serotipo 5 humano), el cual codifica para la enzima bacteriana β -galactosidasa. Las ratas y productos del grupo control recibieron solución salina. Las transducciones con vector (o el tratamiento con solución salina en los controles) se realizaron a los 12 y 15 días post-coito (d.p.c.). Las transducciones se hicieron por dos vías: 1) en la ruta sistémica, las ratas recibieron una dosis endovenosa (i.v., inyección en vena de la cola) de 1×10^{11} partículas de vector (p.v.) y el grupo control recibió solución salina. Para la transducción por la vía intra-amniótica (i.a.), las madres fueron sometidas a laparotomía y la mitad de los productos fueron transducidos con una dosis de 1×10^{10} p.v., mientras que los productos restantes (controles) fueron transducidos con un volumen similar de solución salina. Las madres fueron sacrificadas al 19 d.p.c. para determinar la transducción de órganos maternos y fetales mediante la tinción para X-gal y determinar lesiones malformativas, tóxicas o inflamatorias.

Resultados: En todos los fetos analizados el intestino fue el órgano más transducido (++++), siendo también positivos el cordón umbilical y el amnios. Los fetos transducidos vía i.a. también mostraron transducción en retroperitoneo (+++), pulmón (+++), glándulas suprarrenales (++) y piel (+). Los embriones a estadios medios de gestación manifestaron una sensibilidad extrema a la administración i.a. del vector y a las cargas virales altas, registrándose muerte in-útero hasta en un 70% a 12 d.p.c. En ambas rutas de administración se observó en las madres positividad para β -galactosidasa en hígado, riñón, bazo, cuernos uterinos, etc., destacándose la observación de transducción en encéfalo por las dos vías ensayadas y de ovarios en la ruta i.a. Adicionalmente, en las madres pudo establecerse el desarrollo de una respuesta inmune moderada (+), con presencia de macrófagos y linfocitos, sin el desarrollo de alteraciones morfológicas, ni procesos patológicos en los órganos estudiados. La manipulación a 12 d.p.c. se asoció a alto índice de mortalidad materna (25%).

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció que a las dosis y estadios probados no existe una relación directa entre malformación y transducción adenoviral en productos expuestos aún en embriogénesis activa. Se evidenció la transducción adenoviral en varios órganos fetales (cordón umbilical, amnios e intestino por vía i.v. y cordón umbilical, amnios, intestino, retroperitoneo, pulmón, piel y glándulas suprarrenales por vía i.a.) y transducción por ambas vías en varios órganos maternos (cuernos uterinos, riñón, hígado, pulmón y bazo), resaltándose la transducción del encéfalo (ambas vías) y de ovarios (vía intra-amniótica).

DIRECTOR

Dr. Augusto Rojas Martínez

CO-DIRECTOR

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CO-DIRECTOR

MC. Héctor Gerardo Lozano Garza

CONTENIDO

Resumen	1
Índice de figuras	4
Índice de tablas	6
Lista de abreviaturas	7
I. INTRODUCCIÓN	9
I.I. Adenovirus	9
I.I.I. Aspectos generales	9
I.I.II. Patogenia adenoviral	9
I.I.III. Estructura y replicación	10
I.I.IV. Vectores adenovirales de replicación deficiente	11
I.I.V. Transferencia génica prenatal	12
II. ANTECEDENTES	14
II.I. Infecciones virales	15
II.II. Transducciones virales para terapia génica intrauterina	16
II.III. La rata como modelo experimental para terapia génica intrauterina	24
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. ESTRATEGIA	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
V.I. Origen de los reactivos	31
V.II. Citología vaginal exfoliativa	32
V.III. Tinción de Papanicolaou	33
V.IV. Transducción adenoviral	33
V.IV.I. Transducción intravenosa (i.v.)	34
V.IV.II. Transducción intra-amniótica (i.a.)	35
V.V. Análisis anatomopatológico	35
V.V.I. Tinción con hematoxilina y eosina	36
V.V.II. Tinción para X-gal y rojo rápido nuclear	37
V.V.III. Inmunohistoquímica	37
VI. RESULTADOS	40
VI.I. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral	40
VI.II. Conformación de los grupos experimentales	42
VI.III. Laparotomía exploratoria (estudio piloto con una rata)	43
VI.IV. Escalamiento de la dosis viral	45
VI.V. Transducción intravenosa (i.v.)	49
VI.V.I. Análisis anatomopatológico	50
VI.V.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre	51
VI.V.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos	51
VI.VI. Transducción intra-amniótica	56

VI.VI.I. Análisis anatomopatológico	62
VI.VI.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre	62
VI.VI.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos	67
VII. DISCUSIÓN	72
VII.I. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral	72
VII.II. Conformación de los grupos experimentales	72
VII.III. Estudio piloto	73
VII.IV. Escalamiento de la dosis viral	74
VII.IV.I. Transducciones intra-amnióticas	74
VII.V. Transducción intravenosa	75
VII.VI. Transducción intra-amniótica	76
VIII. CONCLUSIONES	80
IX. BIBLIOGRAFÍA	8x
APÉNDICE A. Embriogénesis de la rata	82
APÉNDICE B. Ciclo estral de la rata	87
APÉNDICE C. Control del medio ambiente para el modelo experimental	88
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	97

FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de un adenovirus	10
Figura 2. Esquema de la estrategia general	30
Figura 3. Técnica de citología vaginal exfoliativa	32
Figura 4. Ciclo estral de la rata	43
Figura 5. Laparotomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos	38
Figura 6. Cierre de heridas quirúrgicas y recuperación post-operatoria	39
Figura 7. Frotis vaginales teñidos por la técnica de Papanicolaou	41
Figura 8. Fetos extraídos de los cuernos uterinos a los 20 d.p.c.	44
Figura 9. Fetos con anomalías en el estudio piloto	45
Figura 10. Transducción de órganos maternos y fetales	46
Figura 11. Análisis de la transducción i.v. para β -gal a 12 d.p.c.	49
Figura 12. Testículo. Tinción H/E	52
Figura 13. Intestino delgado. Tinción X-gal	52
Figura 14. Comparación de la eficiencia de transducción fetal	53

Figura 15. Glándula suprarrenal fetal. Transducción i.v.	
Tinción H/E	54
Figura 16. Piel. Transducción i.v. Tinción H/E	55
Figura 17. Muerte in-útero.	59
Figura 18. Relación de pesos en los estadios de transducción	60
Figura 19. Relación de medidas en los estadios de transducción	61
Figura 20. Lesiones en fetos afectados por la transducción i.a.	62
Figura 21. Órganos maternos teñidos para β-galactosidasa	64
Figura 22. Transducción en cerebro materno (vía i.a.).	
Tinción X-gal	65
Figura 23. Transducción en ovario materno (vía i.a.). Tinción X-gal	66
Figura 24. Diversos tejidos fetales transducidos (vía i.a.).	
Tinción H/E	68
Figura 25. Fetos transducidos i.a. a los 15 d.p.c. Tinción X-gal	69
Figura 26. Funcinitis aguda. Tinción H/E	70

TABLAS

Tabla 1. Agentes virales implicados en patología embrionaria y fetal humana	15
Tabla 2. Efectos teratogénicos producidos por bunyavirus	16
Tabla 3. Estudios preclínicos de terapia génica gestacional	17
Tabla 4. Efectos de la transducción viral en modelos animales en etapas gestacionales tempranas	20
Tabla 5. Distribución de la expresión en ensayos preclínicos de terapia génica intrauterina con vectores adenovirales	21
Tabla 6. Modelación in vivo con administración a órgano blanco	22
Tabla 7. Efectos tóxicos e inmunológicos de la transducción intrauterina	23
<hr/>	
Tabla 8. Hallazgos en la transducción i.v.	56
Tabla 9. Resumen de hallazgos en fetos transducidos	58
Tabla 10. Hallazgos en la transducción i.a.	71

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AdE1 ⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E1
AdE3 ⁻	Adenovirus carentes de la secuencia E3
Al ₂ (SO ₄) ₃	Sulfato de aluminio
CD 4	Linfocitos CD4
CD 8	Linfocitos CD8
CMV	Citomegalovirus
CAG	Citosina, adenina y guanina
d.p.c.	Días post-coito
d.p.t.	Días post-transducción
g	Gramos
hr	Hora
i.v.	Intravenosa
i.a	Intra-amniótica
IgM	Inmunoglobulina M
kpb	Kilopares de bases
K ₃ Fe(CN) ₆	Cianuro de hierro y potasio II
K ₄ Fe(CN) ₆	Cianuro de hierro y potasio III
LTR	Repeticiones terminales largas (del inglés "Long terminal repeats")
MgCl	Cloruro de magnesio
M	Molaridad
ml	Millilitro
μl	Microlitro
min	Minuto
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros

Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en embriones de rata

Na_2HPO_4	Fosfato ácido de sodio
NaH_2PO_4	Fosfato diácido de sodio
No.	Número
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (del inglés "Phosphate-buffered saline")
PFU	Unidades formadoras de placa (del inglés "Plaque Forming Units")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés "Polimerase Chain Reaction")
pH	Concentración de hidrógeniones en solución
pl	Picolitro
p.v.	Partículas virales
p.v.t.	Partículas virales totales
RSV	Virus del sarcoma de Rous (del inglés "Rous sarcoma virus")
s	Segundos
v/v	Relación volumen/volumen
X	Número de magnificaciones al microscopio
X-gal	Reactivo de tinción para el revelado de los productos del gen β -galactosidasa

I. INTRODUCCIÓN

I.I. Adenovirus.

I.I.I. Aspectos generales.

Los adenovirus se aislaron por primera vez en cultivos de células adenoides humanas por *Rowe y cols.* en 1953. A la fecha se han descubierto aproximadamente 100 serotipos y al menos 42 infectan al ser humano (familia Adenoviridae, adeno=glándula, *Enders y cols.*, 1956). Dada su capacidad oncogénica, los mastadenovirus (adenovirus de mamíferos) y los aviadenovirus (adenovirus de aves) producen tumores malignos cuando son inoculados en cobayos recién nacidos (*Tretin y cols.*, 1962). Gracias al enorme conocimiento alcanzado sobre el ciclo viral, los adenovirus han sido utilizados como potentes herramientas de estudio en la replicación de ADN, en la transcripción, el procesamiento del ARN y la síntesis de proteínas en células de mamíferos. Por estas mismas razones, también están siendo utilizados como vectores de expresión en tejidos de mamíferos (*Berget y cols.*, 1977; *Chow y cols.*, 1980).

El genoma adenoviral es fácil de manipular por técnicas de ADN recombinante. Este se replica de manera eficiente en células permisivas, no desarrolla rearrreglos de consideración y los genes foráneos insertados son mantenidos sin cambio a través de sucesivas rondas de replicación viral (*Challberg y cols.*, 1979).

I.I.II. Patogenia adenoviral.

Los adenovirus infectan las células epiteliales que revisten los órganos respiratorios e intestinales (viremia con diseminación visceral). El virus muestra una tendencia a permanecer latente en el tejido linfático, reactivándose por la inmunosupresión o la infección por otros agentes. (*Hogan y cols.*, 1942; *Jawetz y cols.*, 1959; *Wigand y cols.*, 1983).

Entre las enfermedades más comunes producidas por los adenovirus se encuentran las infecciones respiratorias (entre el 5-10 % de las enfermedades respiratorias pediátricas se atribuyen a los adenovirus; diseminadas por contacto respiratorio o fecal-oral), la conjuntivitis, la cistitis hemorrágica y la gastroenteritis caracterizadas por una latencia prolongada (*Wigand y cols.*, 1983).

I.I.III. Estructura y replicación.

Los adenovirus son virus de tamaño intermedio, con un genoma de ADN bicatenario (36 kpb) (*Green y cols.*, 1967). Los viriones están constituidos por una cápsula icosaédrica de 70-90 nm y están compuestos exclusivamente por proteína y ADN. Sus proyecciones o fibras se originan a partir de los 12 vértices de la cápside proteica y que concluyen en botones. Estas dos últimas estructuras son indispensables para la interacción con los receptores celulares. La cápside se compone de 240 capsómeros formados por las proteínas hexónicas y pentónicas (*Horne y cols.*, 1959) (Figura 1).

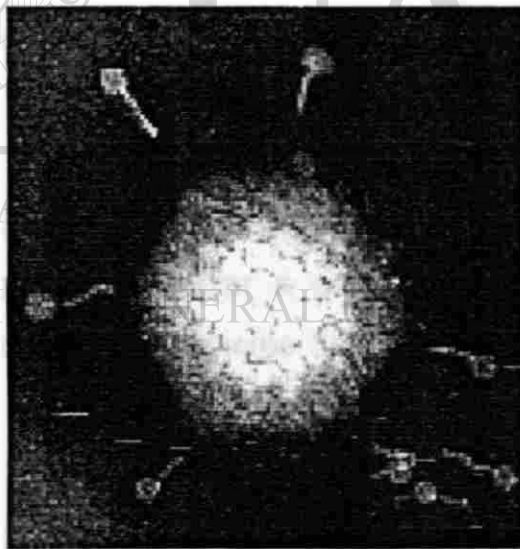


Figura 1. Microscopía electrónica de un adenovirus. Obsérvase la cápside ico-saédrica y algunas fibras, culminando en botones. Algunas fibras se han desprendido en la preparación.

El complejo central del virión contiene el ADN viral y al menos dos proteínas principales. Se conocen a la fecha 11 polipéptidos del virión del adenovirus con una función estructural bien identificada. (*Graham y cols.*, 1991).

La replicación de los adenovirus en cultivo se ha estudiado ampliamente (*Beltz y cols.*, 1979). Esta tiene una duración de 32-36 horas y produce 10,000 viriones o unidades formadoras de placa (PFU, siglas en inglés). Este ciclo viral consta de adhesión, penetración y liberación de la cubierta, así como de procesos genéticos tempranos y tardíos. (*Fenner y cols.*, 1974), según su ocurrencia antes o después de la replicación misma.

I.IV. Vectores adenovirales de replicación deficiente.

Los vectores adenovirales deficientes de replicación han sido utilizados por muchos años en experimentos que requieren un alto nivel de expresión de productos génicos y han sido vehículos efectivos para la administración de vacunas en sistemas experimentales. Sin embargo, no cabe duda que la aplicación más importante de estos vectores se ha producido en el campo de la terapia génica, siendo más utilizados en ensayos clínicos en este tipo de tratamiento experimental. Aunque la utilidad de los vectores adenovirales defectuosos de replicación ha excedido cualquier expectativa, sus limitaciones están también empezando a apreciarse.

Los adenovirus recombinantes con delección de la región E1 (AdE1) propagados en la línea celular derivada de riñón fetal humano 293 (HEK 293), pueden ser usados para transfectar a una población de células blanco, permitiendo una expresión muy eficiente del gen foráneo o transgen bajo el control de un promotor constitutivo.

En el caso de la terapia génica, los transgenes son preferiblemente insertados en el lugar donde se localizaba la región génica E1, aunque se pueden usar otros sitios del genoma adenoviral, tales como la región E3, cuyo producto está involucrado en la regulación negativa para la presentación celular del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y en la evasión de la vigilancia inmune *in-vivo* (*Latchman y cols.*, 1994).

La capacidad total de empacamiento de los vectores adenovirales es de 105% del tamaño del genoma (*Graham FL y col.1995*). Por esta razón, los vectores AdE1⁻ tan sólo pueden albergar transgenes de 1.5 kpb y los que tienen una-delección adicional de E3 pueden permitir acomodar insertos de hasta 7.5 kpb. Los vectores recombinantes adenovirales son capaces de promover la expresión transgénica en células quiescentes, e incluso, en células terminalmente diferenciadas.

Los vectores adenovirales recombinantes pueden llegar a expresar un transgen en la totalidad de las células *in vitro* (*Simon y col, 1993*). Los vectores AdE1⁻ intrínsecamente proveen sólo expresión transitoria. En ensayos *in-vivo* se ha detectado expresión *in vivo* de vectores AdE1⁻ por más de 6 meses en neuronas (*Neve y cols., 1993*) y en células musculares (*Vincent y cols., 1993*). Sin embargo, en otros sistemas la expresión transgénica ha sido menos prolongada como en células endoteliales respiratorias, arterias y venas, linfocitos, macrófagos, hepatocitos, neuronas, células gliales y astrocitos (*Simon y col, 1993* y *Wilkinson y cols., 1994*). Es importante mencionar que la expresión génica de los vectores adenovirales basados en los serotipos 2 y 5 humanos (miembros del grupo C) no está restringida a nuestra especie y que puede analizarse en otras especies de mamíferos como roedores, cerdo, perro, etc., sin embargo, aun no es posible replicar el genoma viral en células no permisivas, incluyendo a las de otras especies diferentes de la humana (*Rojas-Martínez y cols., 1998*).

I.I.V. Transferencia génica prenatal.

A mediados de 1998 se dió inicio a la revisión de protocolos de transferencia génica prenatal (*Liebert, 2000*), tratando de establecer las regulaciones principales que deben regir la terapia génica *in útero*.

Como consecuencia, estas regulaciones implican que la transferencia génica debe poseer un carácter potencialmente benéfico para la prevención o

tratamiento de enfermedades asociadas a riesgos de morbilidad/mortalidad altos y/o de carácter letal para el feto o futuro producto (fibrosis quística, hemofilia A, distrofia muscular, etc.). Adicionalmente, esta terapia sólo contemplará la transducción de células somáticas y nunca se realizará en productos que se espere que se desarrollen normalmente.

Muchas enfermedades congénitas severas son candidatas para terapia génica prenatal, debido a la carencia de un tratamiento postnatal efectivo. Aunque lo anterior tiene un enorme potencial, se reconoce de manera simultánea que existe una carencia de conocimientos preclínicos y de más estudios en modelos animales para la transferencia génica *in útero*, principalmente para vectores adenovirales. Las técnicas utilizadas deben asegurar un alto grado de transducción y de expresión en tipos celulares y tejidos fetales específicos, con la identificación de marcadores que permitan el rastreo de una posible respuesta inmunológica, lo cual abriría una ventana de oportunidades para una transferencia exitosa; es decir, una transferencia antes que el feto pueda reconocer inmunológicamente lo propio de lo extraño.

A todo lo anterior, se aúna el monitoreo del progreso de la gestación o el desajuste posterior en el desarrollo postnatal; además de procesos de mutagénesis insercional y sobre todo de posibles efectos patológicos y toxicológicos generados por la administración del vector. Sobre estos últimos procesos toxicológicos existe una gran preocupación, pues el riesgo de exponer al producto gestacional a una administración del vector en el líquido amniótico o en la cavidad peritoneal es muy grande y las consecuencias son aún desconocidas, principalmente en el campo de la teratogénesis.

II. ANTECEDENTES

Los importantes desarrollos logrados en el campo de la terapia génica desde la introducción de los vectores recombinantes adenovirales, han permitido sostener la idea que la terapia génica *in vivo* es un proceso factible. Sin embargo, la utilidad de estos vectores adenovirales en adultos es aún limitada, debido a las respuestas inmunes, tanto celular como humoral, que se desencadenan contra el vector, el producto del transgen, y por supuesto contra las células transducidas; las cuales ya fueron responsables de un descenso en un ensayo clínico (Thompson, 2000). La terapia intrauterina ofrece la posibilidad de una transducción vectorial con una respuesta inmune atenuada si se realiza antes de la maduración del sistema inmunológico (Zepeda y cols., 1996).

Desde los años setentas se han realizado diversos estudios sobre las consecuencias de la exposición de embriones o fetos a diferentes tipos de agentes virales. Se ha descartado que los embriones puedan ser dañados por agentes toxicológicos en etapas previas a la implantación, incluyendo las etapas de blastocisto y anclaje, debido a la pluripotencialidad de las células embrionarias (Baker y cols., 1980). Aunque los tipos de adenovirus utilizados para la construcción de vectores adenovirales están asociados con infecciones asintomáticas o benignas (infecciones del tracto respiratorio, queratoconjuntivitis y gastroenteritis), estos agentes también pueden ser causantes de bronconeumonía en infantes, y en raras ocasiones, de infección sistémica en individuos inmunocomprometidos. Este tipo de vectores también puede tener riesgos adicionales los embriones o fetos que aún han sido estudiados. Por estas razones existe cierta preocupación sobre la toxicidad potencial asociada al uso de vectores adenovirales recombinantes en embriones o fetos, especialmente cuando se intenten tratamientos múltiples para mantener un efecto terapéutico. Para aclarar más este punto, se hará una breve exposición de las observaciones realizadas sobre la infección viral intrauterina.

II.I. Infecciones virales.

A mediados del siglo pasado empezaron a conocerse los efectos toxicológicos de una gran variedad de virus en las etapas prenatales de nuestra especie, estableciéndose de manera precisa las consecuencias de tal exposición. Entre éstos se pueden citar los incluidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Agentes virales implicados en patología embrionaria y fetal humana.

Agente infeccioso	Efectos Toxicológicos
Virus de la rubéola	Cardiopatías, microcefalia, cataratas, sordera y deficiencia mental
Citomegalovirus	Microcefalia y deficiencia mental
Varicela	Hipoplasia de miembros, microftalmía y deficiencia mental
Herpesvirus	Cáncer
Virus Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt

Las investigaciones realizadas a finales del mismo siglo en ovejas expuestas a bunyavirus en etapas gestacionales tempranas, probaron tener un efecto similar a las infecciones en nuestra especie y evidenciaron que producían malformaciones similares a las observadas en infantes humanos (*Edwards y cols. 1997*). Los principales hallazgos se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos teratogénicos producidos por bunyavirus en ovejas.

Serogrupo	Efectos toxicológicos
La Crosse, San Angelo y Main Drain	Artrogriposis, hidrocefalia, muerte fetal, desviaciones esqueléticas axiales, anasarca y oligohidramnios (<i>Edwards y col. 1997</i>).
Akabane y Valle Cache	Malformaciones músculo-esqueléticas y cerebrales (<i>Parsonson y cols, 1977</i>).

Las ovejas infectadas en los días 30 a 36 del embarazo produjeron corderos deformes, los cuales poseían anticuerpos neutralizantes contra el virus Akabane y presentaban malformaciones como artrogriposis, hidrocefalia, xifosis, escoliosis, microcefalia, decremento marcado en el número de neuronas del cuerno ventral y depleción de mielina, atrofia severa de músculo esquelético y reducción del número de timocitos en la corteza. Los efectos del virus estaban relacionados con la edad gestacional en la cual el feto fue expuesto al virus (*Parsonson y cols, 1977*).

También existen otros virus, como los parvovirus de cadena sencilla, que pueden infectar humanos y otras especies animales. Las infecciones pueden ser citolíticas en grupos celulares selectos y pueden producir defectos específicos del desarrollo o desencadenar efectos más generalizados como anemia, pancitopenia, hemorragia, e incluso pueden producir la muerte fetal (Jordan y cols. 1994).

Al finalizar el siglo XX se comienzan a describir los efectos tóxicos gestacionales de los adenovirus en nuestra especie. En 1995 se documentó por primera vez un caso de neumonía adenoviral fatal en un producto humano de 25 semanas de gestación por microscopía electrónica e hibridación *in-situ* (Montone y cols., 1995). En 1998 se hizo lo propio con un caso de *hydrops fetalis* y taquiarritmia en un feto de 27 semanas, en el que se detectó adenovirus por PCR (Ranucci-Weiss y cols., 1998).

II.II. Transducciones virales para terapia génica intrauterina.

Con la finalidad de establecer tratamientos prenatales para enfermedades hereditarias y letales de alta incidencia, se han realizado estudios preclínicos de terapia génica en diferentes estadios gestacionales, empleando diversos modelos animales. En algunos de estos ensayos se utilizan vectores adenovirales, para registrar patrones específicos de transducción tisular y determinar su eficacia y duración. Diversos estudios demuestran una reacción marcada de anticuerpos neutralizantes contra el vector y el producto proteico codificado por el transgen (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios preclínicos de terapia génica gestacional.

Grupo	Vector viral (transgen)	Vía de administración	Efecto de la transducción
Vincent y cols.	Adenovirus (β -galactosidasa)	intratraqueal (ovejas)	Infiltrados celulares en pulmón (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) respuesta inflamatoria considerable a (14 d.p.t.)
McCray y cols.	Adenovirus (β -galactosidasa)	Líquido amniótico	Intensa expresión en epidermis fetal y membranas amnióticas, poca expresión gastrointestinal y epitelio de vías aéreas. Hiperplasia reactiva y metaplasia escamosa en epitelio traqueal. Infiltrados celulares inflamatorios en el tejido pulmonar con CD4, CD8, IgM y células efectoras a granulocitos/macrófagos, y presencia de anticuerpos antivirales (7 d.p.t.).
Pitt y cols.	Retrovirus (β -galactosidasa)	Vías aéreas	Expresión en epitelio y espacio submucoso de vías proximales y epitelio respiratorio de vías distales.
Tsukui y cols.	Adenovirus (β -galactosidasa)	Estado pronuclear (huevos libres de zona pelúcida)	Sin cambios morfológicos o efectos citotóxicos aparentes a estadios de mórula y blastocistos.
Holzinger y cols.	Adenovirus (β -galactosidasa)	Intra-amniótica	Membrana amniótica. Menores niveles en aparatos digestivo y respiratorio; engrosamiento intersticial difuso, neutrófilos intraluminales en las vías aéreas distales, agregados de macrófagos intersticiales y linfocitos en tejido pulmonar.

También se ha explorado la posibilidad de la transferencia génica con vectores adenovirales en placenta humana, transduciendo células de citotrofoblasto. El vector transdujo eficientemente las células mononucleares del citotrofoblasto, pero las células mostraron una marcada reducción en la eficiencia de transducción después de la diferenciación terminal a trofoblastos sincitiales multinucleados (MacCalman y cols., 1996). Este resultado puede implicar limitaciones en la utilidad de la terapia génica realizada en este tejido y en los niveles de transducción fetal. Así mismo, se ha establecido que la transducción de células trofoblásticas por vectores basados en virus herpes simplex y virus adenoasociados se ve afectada por la diferenciación celular, lo cual puede tener las mismas repercusiones mencionadas para los vectores adenovirales (Pamy y cols., 1998).

En 1997, Cheng y cols. definieron los niveles de transducción con un vector adenoviral E1⁻ comparando líneas celulares generadas a partir de diferentes espacios del intestino de rata con la transducción intestinal *in-vivo* en ratas Sprague Dawley. Ellos encontraron que las líneas celulares poseen más altos índices de transducción que los modelos *in vivo*. Estos estudios también determinaron que la distribución de la transducción era positiva en duodeno, yeyuno, ileon y algunas partes del colon. La transducción aumentó después de la administración de dosis secundarias, encontrándose picos en los días 3 y 4, y que decreció entre los días 7 y 14. Estos autores no encontraron anticuerpos en suero después de las transducciones (Cheng y cols., 1997).

Para evaluar la factibilidad de usar la terapia génica *in vivo* durante los estadios iniciales de la organogénesis de modelos en mamíferos, se realizaron varios ensayos empleando diversas especies, diferentes tipos de vectores y en diferentes etapas del desarrollo gestacional. Como se muestra en la Tabla 4, en la mayoría de los experimentos no se encontraron afecciones notorias en la morfología externa de los fetos transducidos; sin embargo las variaciones en las dosis de los vectores provocaron malformaciones severas en algunos estudios. Los patrones de traducción fetal con vectores adenovirales administrados en la placenta o por vía sistémica a la madre durante el desarrollo intrauterino, se muestran en la Tabla 5. Estos experimentos reportan patrones de transducción extensa y en algunos casos, muestran efectos tóxicos en la madre.

Alternativamente, algunos investigadores han ensayado la administración directa al órgano blanco fetal, utilizando endoscopía, inyección directa en órgano blanco, o inyección guiada con ultrasonido, con la finalidad de establecer patrones transduccionales más limitados (Tabla 6).

Tabla 4. Efectos de la transducción viral en modelos animales en etapas gestacionales tempranas.

Investigador	Vector viral (transgen)	Transducción (d.p.c.) vía de administración	Efectos de la transducción
Kubisch y cols. (1997)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Intra-amniótica (2.5×10^5 pfu/100 μ l)	6% de las ratas en cultivo llegan al estado de blastocisto vs 62% de controles. Retardo en el crecimiento in vivo (Observado previamente por Neighbour PA, 1978).
Baldwin y cols. (1997)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Embriones postgas-trulación. Evaluación: 36-48 hrs post-transducción.	Efectos adversos no detectables en el desarrollo normal durante la morfogénesis temprana. Patrones de transducción dependientes de promotor (CMV, RSV y LTR).
Harting y cols. (1998)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Neurulación activa	6×10^8 partículas/ μ l: Malformaciones severas. 1.5×10^8 partículas/ μ l: No se observan malformaciones.

Tabla 5. Distribución de la expresión en ensayos preclínicos de terapia génica intrauterina con vectores adenovirales.

Investigador	Viral Vector (Transgen)	Vía de administración	Efectos de la transducción
Turkay y cols. (1999)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Microinyección Intraplacentaria	Corazón e hígado (9.5 y 11.5 d.p.c.). Menor transducción en sistema vascular y cerebro posterior. Expresión del transgene hasta dos meses posteriores al nacimiento (baja frecuencia).
Lipshutz y cols. (1999)	Adenovirus (Luciferasa)	Inyección intraperitoneal, intrahepática, e intramuscular (15 d.p.c.). 1×10^8 y 1×10^{10} p.v.l.	Alta expresión en cerebro, intestino, hígado y pulmón, persistencia de expresión de 32 días. Intramuscular: estroma de la médula espinal, hígado, pulmón y ganglio de la raíz dorsal. No hay señales de inflamación. Elevación considerable de transaminasas hepáticas en la madre, pero sin alteración en el feto.

Tabla 6. Transducción viral en modelos *in-vivo* de administración viral en órgano blanco.

Investigador	Viral Vector Transgen	Vía de administración	Efectos de la transducción
Yang y cols. (1999)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Fetoscopia intratraqueal	Eficiente transducción en alvéolos a los 14 d.p.c., con evidencia de respuesta inmune. La transducción temprana produce alta expresión en hígado, glándulas adrenales, riñones y endocardio, sin la producción de anticuerpos neutralizantes.
Wood y cols. (1999)	Adenovirus (Luciferasa)	Inyección órgano-específica.	Expresión del vector en órgano blanco y zonas aledañas. Transducción sistémica (hígado), con una dispersión homogénea en los órganos analizados.

Varios investigadores han analizado los efectos tóxicos y la respuesta inmunológica en el feto después de la transducción con vectores adenovirales (Tabla 7). Con respecto a la toxicidad de los vectores adenovirales, la proteína pentona (componente de la cápside), puede ser citotóxica a una concentración elevada. Las altas dosis de transducción también pueden producir replications virales limitadas. Adicionalmente, ciertos tipos celulares poseen una actividad endógena tipo E1, la cual pudiese potencialmente permitir que ocurriera una replicación limitada del virus (Engelhardt y cols., 1993). El estudio más detallado que ha sido publicado, basado en una transferencia génica mediada por vectores adenovirales a mandriles, ha demostrado que altas dosis del agente pueden inducir respuesta inflamatoria en el pulmón, probablemente inducida por las proteínas adenovirales en el inóculo (Bunnell y cols., 2000).

Tabla 7. Efectos tóxicos e inmunológicos de la transducción intrauterina.

Investigador	Vector viral (transgen)	Vía de administración	Efectos tóxicos
Iwamoto y cols. (1999)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Inyección intraute-rina	Más del 10% de los fetos muere <i>in utero</i> . La muerte no está asociada al proceso quirúrgico o agentes anestésicos. Considerable respuesta inflamatoria. La exposición repetida está asociada a mortalidad y patologías considerables.
Jerabtsova y cols. (2000)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Inyecciones intramusculares, intrahe-pática y retroorbitales (directa). Intra-amniótica e intraplacentaria (no directa). Dosis límite 1×10^{10}	No directa: Poca expresión en órganos internos del feto, sólo piel y tubo digestivo. Poca expresión en hígado. Directa: Expresión en el área de transducción. Relación lineal dosis:muerte fetal.
Gaensler y cols. (2000)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Estados gestacionales específicos con inyecciones posteriores en edad madura.	No desarrollo de inmunidad al vector y niveles de expresión similares a los nativos en inyecciones tardías.
Larson y cols. (2000)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Estados gestacionales específicos en <i>Macaca mulatta</i>	Actividad visible a los 30 d.p.t. Transducción en pulmones e intestino, sin efectos adversos en la madre. Liberación de producto transgénico del pulmón a la circulación, túbulos proximales y vejiga. PCR negativo en tejidos que no poseen contacto con líquido amniótico.
Lipshutz y cols. (2000)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Inyección intrahepática (15d.p.c.) y consecuentes inyecciones post nacimiento	No producción de respuesta inmune humoral al vector o producto transgénico. Desarrollo de anticuerpos al adenovirus en grupos experimentales y controles.
Masato y cols. (2000)	Adenovirus (β -galactosidasa)	Inyección intra-amniótica, placentaria y espacio intraperitoneal	Niveles de transducción baja en ratones y alta en cobayos, detectándose expresión principalmente en hígado, corazón, bazo y glándula adrenal. Niveles más bajos en riñón, intestino y placenta.

II.III. La rata como modelo experimental para terapia génica intrauterina.

A la fecha, el modelo animal preclínico preferencialmente utilizado para las intervenciones intrauterinas es el ratón (*Mus musculus*) y los experimentos realizados incluyen manipulaciones *ex vivo* de células pluripotenciales y transducciones específicas a órganos blanco previamente determinados. El modelo, sin embargo posee la limitante concerniente al tamaño del animal y de sus embriones (dificultad en la manipulación del producto).

La rata ofrece muchas ventajas para los estudios toxicológicos intrauterinos. Posee un ciclo reproductivo corto, un alto grado de fecundidad con un alto número de crías, un rango bajo de malformaciones espontáneas y fetos convenientemente grandes y fáciles de manipular, encontrándose que las ratas con un peso de 200-225 g son las más adecuadas para este tipo de protocolos preclínicos. Tiene un periodo embrionario proporcionalmente grande, que abarca hasta el día 19 días post-coito (d.p.c., gestación 20-21 días). Adicionalmente, este animal es relativamente resistente a enfermedades y tolera bien los procedimientos quirúrgicos de gran magnitud (*Bragg y cols., 1922; Job y cols., 1935*). Los reportes de transducciones adenovirales en rata (*Rattus norvegicus*) son escasos y no existen protocolos diseñados para este modelo animal donde se estudien los efectos de la transducción, tanto en el producto como en la madre, después de la administración endovenosa sistémica e intra-amniótica en periodos gestacionales específicos. Tampoco se sabe mucho sobre los efectos toxicológicos asociados a esta transducción.

III. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se propuso estudiar los efectos tóxicos de los vectores adenovirales durante la embriogénesis, después de la transducción sistémica endovenosa o intraamniótica en ratas preñadas. Se planteó estudiar los efectos toxicológicos que estarían relacionados con las actividades biológicas de los vectores adenovirales, con la expresión del gen terapéutico y/o marcador, y con los efectos debidos a la respuesta inflamatoria dentro del ambiente intrauterino. Así mismo, se intentó establecer un patrón de transducción específico para los estadios pre-establecidos de 12 y 15 d.p.c., para determinar posibles asociaciones entre tejido transducido y daño toxicológico, tanto en el producto, como en la madre.

Se espera que el conocimiento generado en este trabajo contribuya a aportar datos sobre la seguridad de las aplicaciones de la terapia génica *in-utero* y a la prevención de defectos en productos y madres que recibieran tratamientos con estos vectores durante los períodos tempranos del embarazo.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Este estudio fue desarrollado mediante la implementación de varias técnicas que permitieron establecer criterios específicos para estudiar la asociación entre transducción con vector adenoviral *in vivo* y efecto toxicológico en los productos. La Figura 2 ilustra los pasos de la estrategia de este estudio.

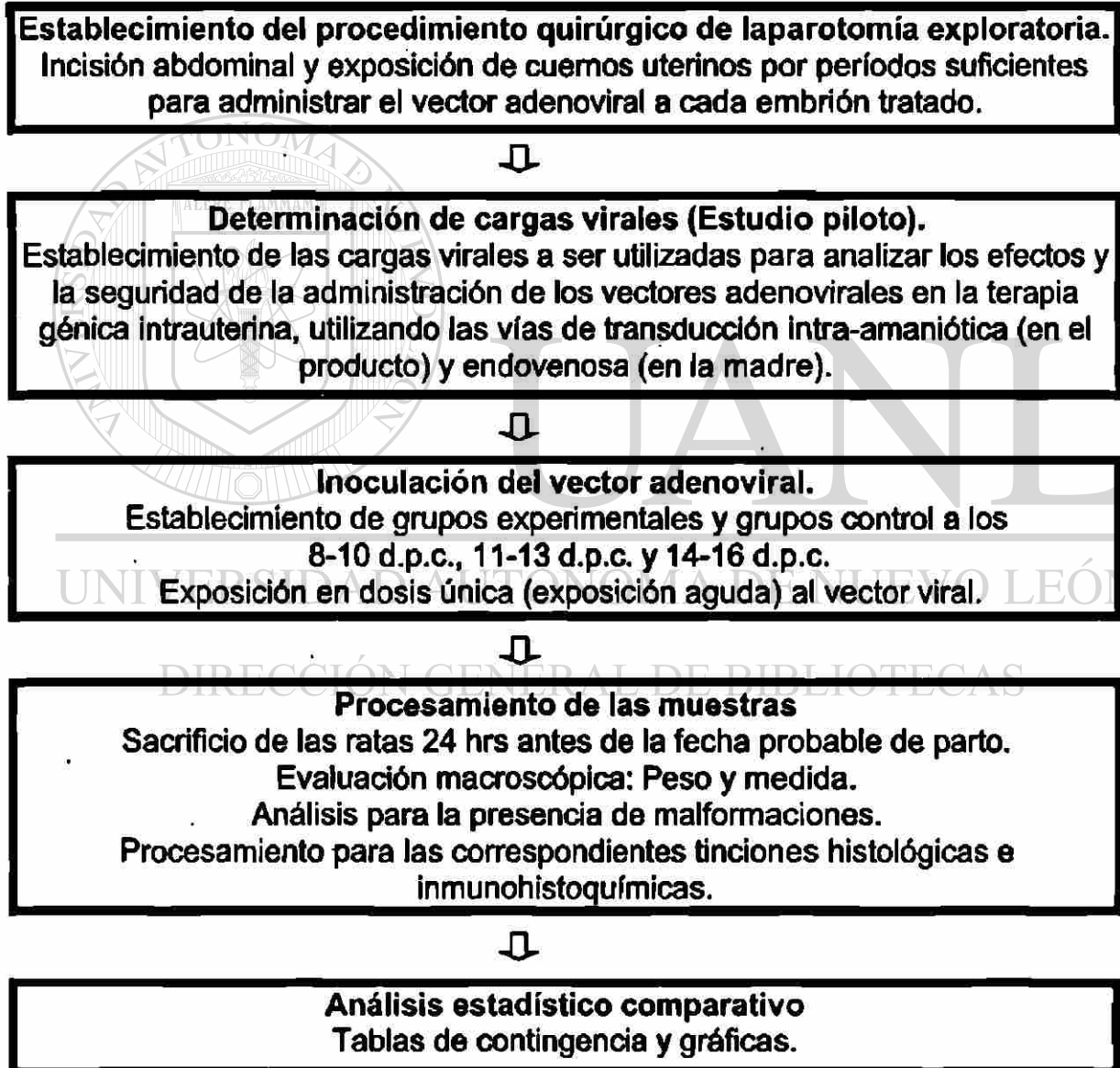


Figura 2. Estrategia general. Resumen de las etapas que constituyeron el estudio.

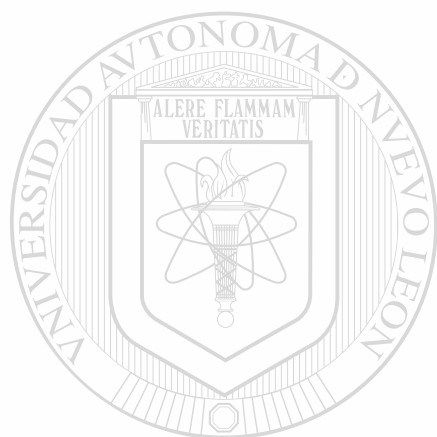
Inicialmente se estandarizó el proceso quirúrgico de laparotomía exploratoria para la transducción intra-amniótica. Este proceso quirúrgico invasivo, permitió determinar las consecuencias de las intervenciones intra-amnióticas en diferentes estadios gestacionales para el producto y la madre, así como la naturaleza y frecuencia de los efectos adversos. Este procedimiento está basado en la realización de una incisión de la pared abdominal y la exposición de cuernos uterinos por períodos suficientes para administrar el vector adenoviral a cada embrión tratado.

Una vez confirmada la viabilidad del método, fueron establecidas las dosis virales a ser utilizadas para analizar los efectos y la seguridad de la administración de los vectores adenovirales en la terapia génica intrauterina, utilizando las vías de transducción intra-amniótica (en el feto) y endovenosa (en la madre). Dichas dosis estuvieron basadas tanto en los criterios de dosis letal media para la madre, como la obtención del mayor número de malformaciones y efectos toxicológicos con la menor cantidad de vector administrado en una dosis única por las vías endovenosa e intra-amniótica (exposición aguda).

Se inició con un estudio piloto en el que se analizaron los efectos tóxicos de la transducción en tres grupos de edad gestacional: 8-10 d.p.c., 11-13 d.p.c. y 14-16 d.p.c. Estos estadios estuvieron sujetos a cambios o modificaciones dependiendo de los resultados obtenidos y de la obtención de productos viables al momento del sacrificio de las madres. Los resultados de este estudio piloto generaron las condiciones del trabajo para analizar los efectos tóxicos en estadios gestacionales precisos en cada grupo experimental y su correspondiente control.

Debido a las posibles malformaciones presentes en los productos obtenidos en los grupos experimentales, las ratas fueron sacrificadas 24 hrs antes de la fecha probable de parto, para evitar que la madre devorara los productos malformados o muertos. Los fetos recuperados en las madres

tratadas fueron pesados y medidos antes de la disección y el procesamiento para las correspondientes tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. Un análisis histológico de secciones y tejidos particulares determinó la presencia del vector adenoviral en los tejidos maternos y fetales. Los resultados obtenidos se consignaron en tablas de contingencia, las cuales fueron empleadas para estudios estadísticos y generación de gráficas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.I. Origen de los reactivos.

Harlan-México, S.A. de C. V.

Ratas Sprague Dawley (peso aproximado de 200-250g.)

<https://www1.fishersci.com>

Suero fisiológico	NaCl 0.9%
Alcohol etílico	C ₂ H ₅ OH
Eter dietílico	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅
Hematoxilina de Harris	
Ácido clorhídrico	HCl
Hidróxido de amonio	NH ₄ OH
Xileno absoluto	C ₆ H ₄ (CH ₃)
Fosfato dibásico de sodio	Na ₂ HPO ₄
Fosfato monobásico de potasio	NaH ₂ PO ₄
Cloruro de sodio	NaCl
Cloruro de potasio	KCl
Formaldehído	HCHO
Sulfato de aluminio	Al ₂ SO ₃
Cianuro férrico de potasio	K ₄ Fe(CN) ₆
Cianuro ferroso de potasio	K ₃ Fe(CN) ₆
Doxicolato de sodio	C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄
NP-40	

<http://www.sigmaaldrich.com/>

OG-6

EA-50

Bálsamo de Canadá

Rojo rápido nuclear.

Peroxidasa endógena

Anticuerpo primario Ad5-antiratón

Anticuerpo secundario conejo-antiratón IgG.

<http://www.wyeth-pharmaceutical.com>

Ketamina (Ketaset)

Xilacina (Rompun)

<http://www.hamiltoncomp.com>

Jeringa Hamilton N-701 (Cemented Needle)

<http://www.shandon.com/>

Thermo Shandon Citadel 1000

Shandon Histocentre 2

**Criostato Microm (HM 505N)
Labline Hot Plate**

V.II. MÉTODOS.

V. II.I. Citología vaginal exfoliativa.

Las muestras vaginales fueron obtenidas de ratas jóvenes adultas cepa Sprague Dawley con un peso aproximado entre 200-250gs. Estas fueron colocadas en posición decúbito ventral como se muestra en la Figura 3. Se utilizó suero fisiológico (NaCl 0.9%) como vehículo para hacer los lavados vaginales.



Figura 3. Técnica de citología vaginal exfoliativa. Esta técnica es la más rápida para la determinación del embarazo con un mínimo de manipulación y con casi un 100% de confiabilidad en el diagnóstico.

El material obtenido fue colocado en un portaobjetos y secado a la flama suave del mechero.

V. II.II. Tinción de Papanicolaou.

El proceso de fijación del lavado vaginal fue realizado con una mezcla de alcohol:éter relación 1:1, v/v, por espacio de 15 a 20 min. Posteriormente, las laminillas fueron sumergidas en alcohol etílico al 96%, 80% y 70%. Se realizaron baños sucesivos en agua corriente y se procedió a teñir con hematoxilina de Harris por 5 min.

Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados y sumergidos en ácido clorhídrico al 0.5% e inmediatamente después, estos fueron sumergidos en agua y mantenidos en hidróxido de amonio al 0.5% por 30 s. A continuación se realizó una deshidratación progresiva con etanol al 70%, 80% y 96%. Finalmente, el material se tiñó con un segundo colorante (OG-6) por 4 min. Un paso intermedio en alcohol al 96%, dió pie al colorante citoplasmático final EA-50 por 3 min. La deshidratación y el montaje final de las laminillas incluyeron baños en alcohol al 96%, 100%, xileno por 5 min cubreobjetos y resina bálsamo de Canadá.

Las muestras fueron observadas mediante microscopía de luz identificando las fases del ciclo estral. (Refiérase al Apéndice B). Una vez que fue detectado el estadio de pro-estro, las ratas fueron apareadas con machos jóvenes adultos de la misma cepa con un peso aproximado de 350g. A la mañana siguiente del apareamiento, se realizaron citologías vaginales exfoliativas para detectar espermatozoides. La presencia de éstos determinó el día 0 post-coito (d.p.c.).

V.II.III. Citologías vaginales y determinación del ciclo estral.

El ciclo estral de la rata fue determinado con la finalidad de conocer la morfología y los cambios histológicos en las células vaginales, que nos permitieran determinar el tiempo en el cual la rata era fértil. Este período de

fertilidad, que son aproximadamente 12 horas, nos permitiría aparear a las ratas y establecer el estadio gestacional de manera confiable.

Debido a lo anterior, cinco hembras fueron separadas del resto de las ratas disponibles para el estudio y a éstas les fueron tomadas mediante gotero las muestras vaginales, bajo las especificaciones mencionadas en materiales y métodos, lográndose establecer un ciclo estral completo (Figura 4).

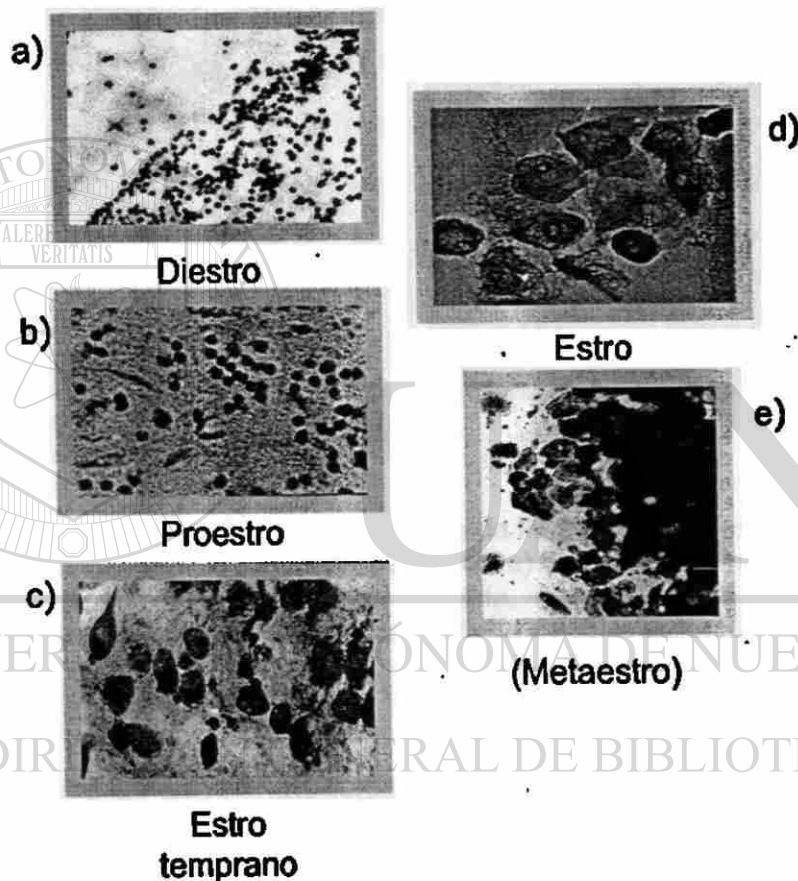
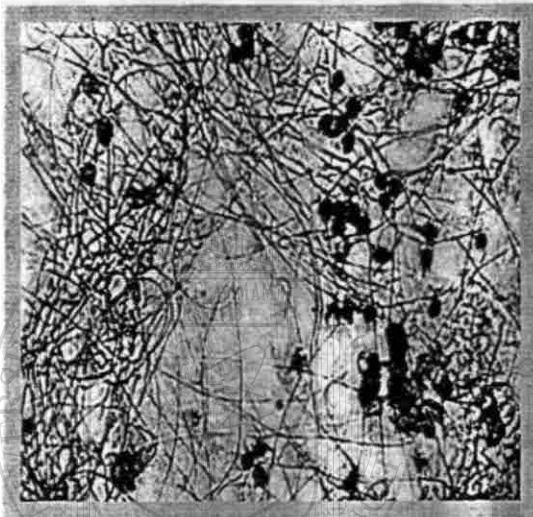


Figura 4. Ciclo estral de la rata. Tinción de Papanicolaou, visualizada por microscopía de luz. a) Diestro. Abundantes linfocitos y células de la capa basal (10X). b) Proestro. Células epiteliales con citoplasma basófilo (20X). c) y d) Aumento de células cornificadas (40X). e) Metaestro. Desaparecen células cornificadas y aumentan leucocitos para dar inicio a un nuevo ciclo (40X).

Una vez identificadas las células características de cada ciclo (refiérase al apéndice B de este trabajo), se procedió a aparear las hembras en grupos de 10 ratas hembras con dos machos fértiles. Cinco ratas en el estadio de proestro

fueron colocadas en una caja con dos machos fértiles por espacio de toda una noche. A la mañana siguiente, los machos fueron sacados de las cajas y las hembras examinadas para la presencia de espermatozoides en la vagina. Se realizó una citología vaginal que fue teñida con la técnica de Papanicolaou (Figura 5).

a)



b)

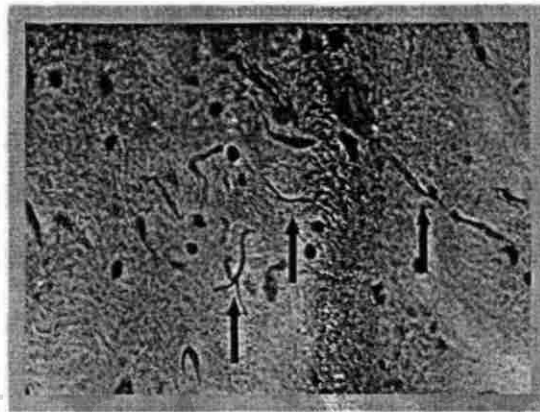


Figura 5. Frotis vaginales teñidos por la técnica de Papanicolaou. Los frotis muestran la degradación encontrada del material espermático. a) Cabezas y colas espermáticas con una morfología completa en su gran mayoría, después de la cópula (40X). b) Remanentes de cabezas y degradación completa de las colas espermáticas (60X).

La presencia de espermatozoides en el estudio determinó el día 0 d.p.c.

Las ratas gestantes fueron colocadas en cajas separadas del resto de las ratas no gestantes y conservadas en un lugar distante hasta que les fue practicada la transducción adenoviral.

V. II.VI. Trasducción adenoviral.

La transducción fue realizada utilizando el vector adenoviral AdV-CMV- β gal, un vector adenoviral tipo 5 con delección de los genes E1 a, E1b y E3; que contiene el gen reportero *lacZ* de *Escherichia coli* bajo el control del promotor constitutivo temprano del citomegalovirus humano (HCMV).

Este vector fue donado por el Dr. Estuardo Aguilar Córdova (Laboratorio de Vectores de Terapia Génica del Centro para Terapia Génica y Celular del Colegio Baylor de Medicina, en Houston, Texas). El vector preparado a una concentración de 1×10^{12} pv/ml, fue administrado a dos grupos de ratas: 20 ratas en el grupo de transducción intravenosa (i.v.) y 10 más en el grupo de transducción intra-amniótica (i.a.). Cada grupo se subdividió en dos subgrupos de edad gestacional para explorar los efectos de la transducciones a los 12 y 15 d.p.c. Los detalles de los procedimientos realizados en las dos rutas mencionadas se explican a continuación.

V. II.V. Transducción Intravenosa.

Para este grupo, se utilizaron cinco ratas para ser transducidas con el vector AdV-CMV- β gal y otras cinco sirvieron como control en cada estadio gestacional. La transducción se realizó con una carga viral de 1×10^{11} pv y las ratas control fueron inyectadas con suero fisiológico (NaCl 0.9%) con una aguja calibre 29 X 13 mm.

Posterior a la transducción, las ratas fueron conservadas en sus jaulas hasta el día 19 d.p.c., fecha en la cual fueron sacrificadas por dislocación cervical bajo previa sedación con éter. Una vez sujetadas de sus cuatro extremidades a la tabla de cirugía, se incidió en la línea blanca abdominal con la finalidad de exponer los cuernos uterinos para contar y recuperar los fetos así como para determinar la presencia de glándulas metriales. Posteriormente los fetos fueron liberados del cuerno uterino y de su saco amniótico; medidos, pesados y analizados macroscópicamente para determinar la presencia de posibles malformaciones. En lo que respecta a la madre se disecaron: cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones y ovarios. Cada órgano fue analizado macroscópicamente para explorar la presencia de procesos patológicos.

V. II.VI. Transducción intra-amniótica.

Este grupo fue sometido al proceso quirúrgico laparatomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos. Las ratas fueron anestesiadas con una solución de Ketamina (Ketaset, 100 mg/ml) y xilacina (Rompun, 20 mg/ml), 2:1, v/v, a 1 µl/g de peso.

Las ratas fueron sujetadas, se realizó asepsia, tricotomía del área abdominal y la posterior antisepsia del área de trabajo. La incisión se realizó en el ámbito de la línea blanca, disecándose piel y músculo. Posteriormente, se localizaron los cuernos uterinos, los cuales fueron expuestos y acomodados para el conteo de embriones en cada uno. La inyección intra amniótica con rector o solución salina se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Algunos sacos amnióticos del cuerno uterino izquierdo fueron transducidos con vector adenoviral, mientras que los del cuerno derecho fueron inoculados con suero fisiológico, sirviendo estos últimos como control del estudio. Se realizó la punción del cuerno uterino y saco amniótico con una jeringa Hamilton (N701), sin puncionar el feto, administrándose una carga viral de 1×10^{10} pv. Finalmente se reintrodujeron los órganos expuestos y se realizó el cierre de cavidad utilizando seda quirúrgica 000. Se hizo el monitoreo de la herida quirúrgica diariamente (Figuras 6 y 7).

Las ratas fueron sacrificadas a los 19 d.p.c. por dislocación cervical, previa sedación con éter. La recuperación de los fetos se realizó de la misma manera que en la transducción i.v.

V.II.VII. Análisis anatomopatológico.

El material biológico extraído (fetos, cuernos uterinos y órganos de la madre), fue conservado en formol al 10% en buffer de fosfatos 0.9% solución salina (KCl 3.75 mM, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH=7.4) por espacio de 24 horas. Posteriormente se hizo un lavado con formol al 10%, para finalmente ser añadido alcohol al 70% por espacio de 3 días. El

procesamiento de los fetos se llevó a cabo disecándolos sagitalmente procediendo de la misma forma con su placenta. Los órganos de la madre por su parte, fueron disecados sagital y coronalmente.

El proceso de inclusión en parafina, se llevó a cabo por encapsulación en histosette I manteniéndose en formol por 24 horas. Posteriormente valiéndose del aparato ThermoShandon Citadel 1000, las muestras fueron incluidas en parafina en un lapso de 19 horas, pasando en este tiempo por formol, alcohol al 70%, 80%, 96%, xileno y finalmente dos baños de parafina. Los bloques de parafina sólida fueron realizados en el aparato Shandon histocentre 2. De cada muestra incluida se realizaron 2 cortes de un grosor de 6 micrómetros con criostato (Microm HM505N) se extendieron en un baño de flotación de tejido Lab-line a 40°C, para posteriormente ser montados en portaobjetos de 25X75 mm. Los dos cortes obedecen a la comparación entre daño y/o malformación asociada a la presencia del vector adenoviral, por medio de tres tinciones: Hematoxilina y eosina, X-gal y rojo rápido nuclear.

V.II.VII.I. Tinción con hematoxilina y eosina.

Una vez montados los cortes en portaobjetos fueron colocados en una fuente de calor para liberar el tejido de la parafina (Hot Plate, Lab-Line) y sumergidos en Xileno por espacio de 10 min. Subsecuentemente por períodos de 3 min, se hidrataron con etanol al 100%, 96% y 80%, para finalmente realizar 10 inmersiones en agua corriente, y ser teñidos en hematoxilina de 4-8 min.

Un paso intermedio en agua corriente fue seguido de ácido clorhídrico al 0.5% e hidróxido de amonio al 0.5%, para enseguida sumergirse en agua corriente nuevamente. El paso por el colorante eosina duró 30 a 45 s. Los cortes se deshidrataron con etanol en pasos sucesivos de 80%, 96% y 100% para finalmente ser mantenidos en xileno por espacio de 5 min y montados con cubreobjetos y la resina bálsamo de Canadá.

V.II.VII.II. Tinción para X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactósido) y rojo rápido nuclear.

Estos cortes se hicieron con el mismo tratamiento de hidratación que los procesados por hematoxilina y eosina. Valiéndose de la mezcla de solución de revelado ($K_3Fe(CN)_6 + K_4Fe(CN)_6$ 200mM, deoxicolato de sodio 0.024 M, NP-40 2 ml, MgCl 1M) y solución de tinción X-gal (X-gal 0.097M en formamida), las laminillas fueron conservadas en la solución por espacio de 2 horas hasta un lapso no mayor a 3 días. Se realizó la contratinción con rápido rojo nuclear ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 0.075M, 0.5 g de rojo rápido nuclear y timol). El proceso de montaje fue similar al mencionado anteriormente para las otras distinciones. Las laminillas fueron analizadas bajo microscopía de luz (Microscopio Zeiss) a 10, 40 y 60X.

V.II.VIII. Inmunohistoquímica.

Para realizar el análisis Inmunohistoquímico se desparafinizaron e hidrataron las muestras hasta un lavado final en buffer de fosfatos. Se bloqueo con peroxidasa endógena en PBS por espacio de 30 min. Paso seguido, se adicionó el bloqueador por espacio de 30 min a temperatura ambiente.

La adición del anticuerpo primario por 3 min fue seguida por posteriores lavados con buffer de fosfatos, para finalmente añadir el anticuerpo secundario. La adición del conjugado enzimático y el sustrato cromógeno constaron ambos de 5 min, para finalmente lavar con agua destilada y contrastar con hematoxilina de Mayer y montar las muestras valiéndose de cubreobjetos y bálsamo de Canadá.

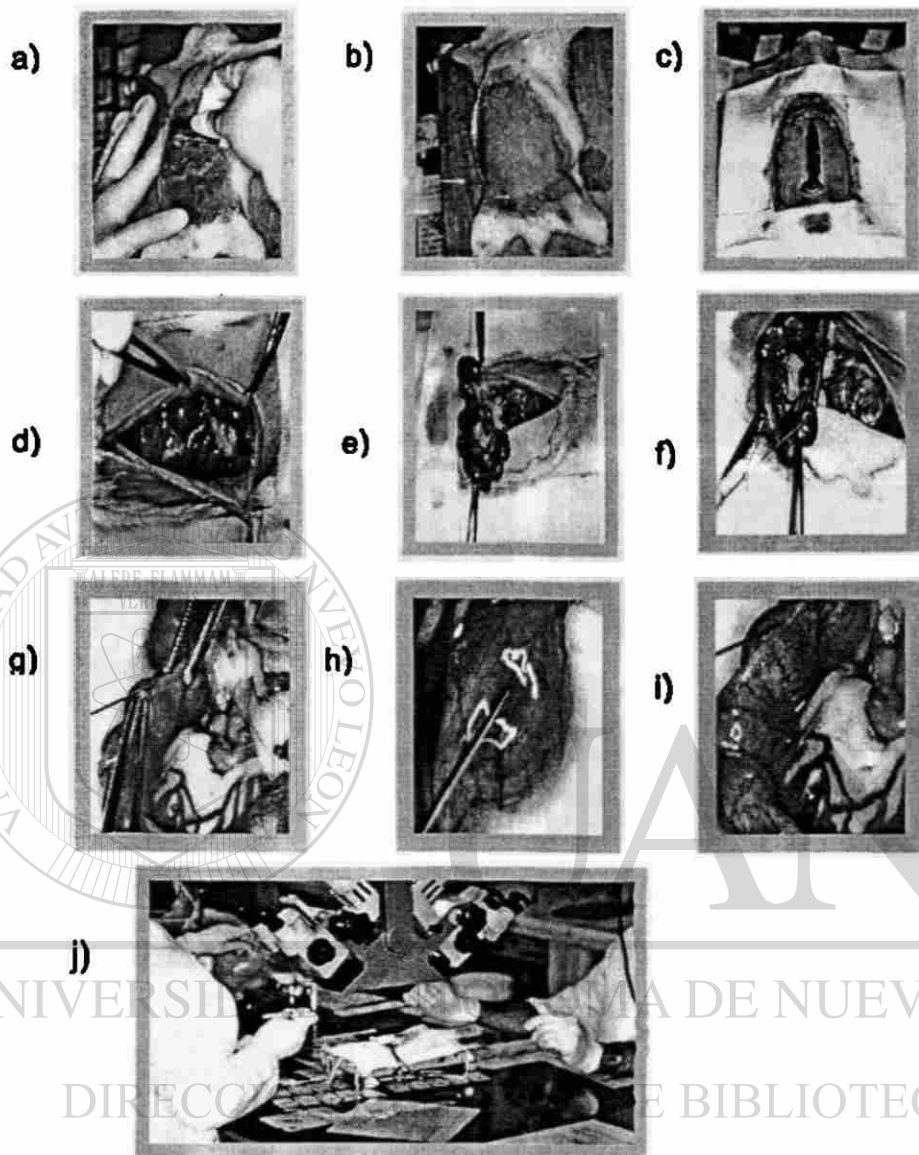


Figura 6. Laparotomía con exposición de cuernos uterinos. Las fotografías muestran las técnicas de asepsia y antisepsia del área quirúrgica, a y b. La incisión en cavidad abdominal de carácter longitudinal, c. Disección y aislamiento de cuernos uterinos, d y e. Transducción a los productos gestantes (1×10^{10} p.v.) valiéndose del microscopio estereoscópico Carl Zeiss f 125, f, g, h, i y j.

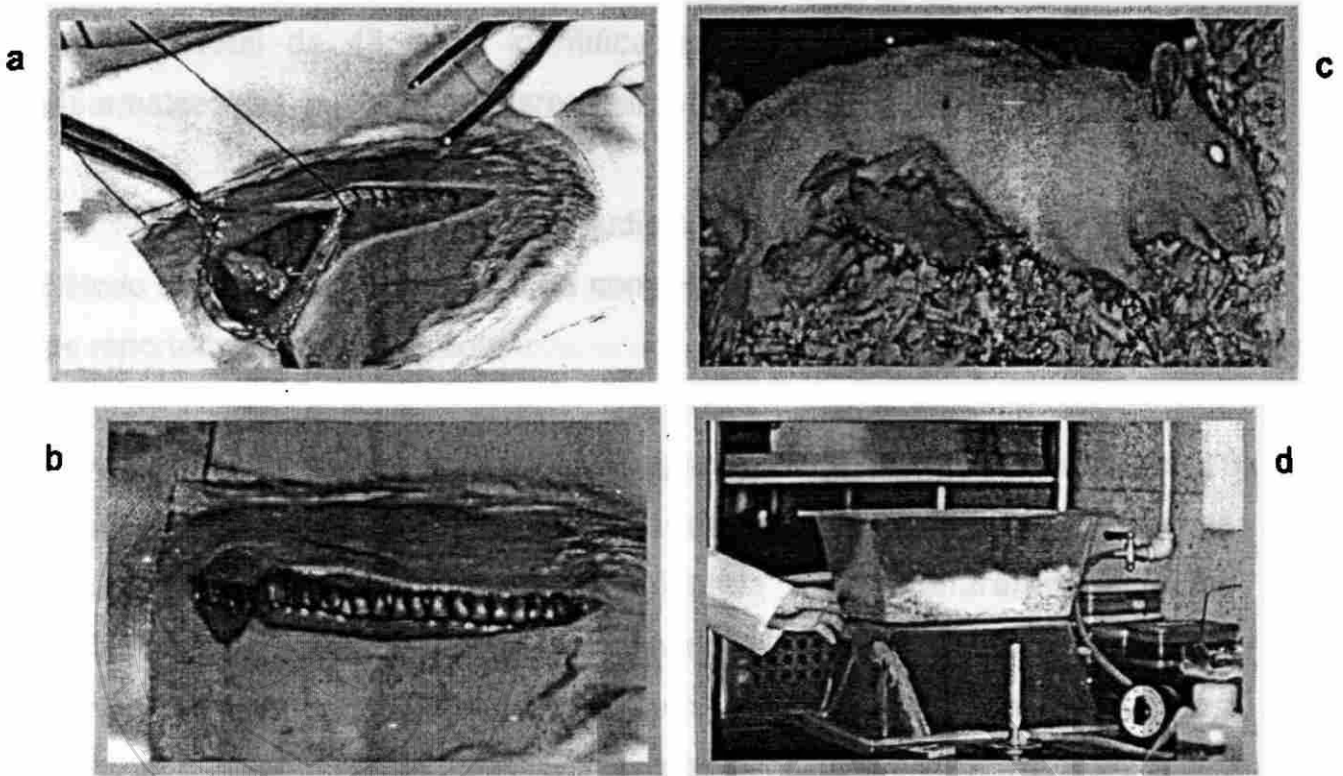


Figura 7. Cierre de heridas quirúrgicas y recuperación post-operatoria. a y b): Suturación mediante la técnica de surjete continuo por planos con candado. c y d). Disposición lateral del animal para su recuperación cerca de una fuente de calor.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

VI. RESULTADOS

VI.1. Conformación de los grupos experimentales.

Un total de 48 ratas identificadas como gestantes (presencia de espermatozoides en citología) fueron utilizadas con los siguientes propósitos:

Una rata fue utilizada en un estudio piloto para determinar la viabilidad del método de laparotomía exploratoria con exposición de cuernos uterinos, como fue reportada por Liphutz y cols.

Seis ratas fueron sometidas a laparotomía exploratoria en diferentes estadios de gestación para determinar si estas ratas sobrevivirían al proceso operatorio y a la carga viral administrada en los diferentes estadios gestacionales propuestos para este estudio. De las anteriores, una rata fue sometida al proceso quirúrgico a las 9 d.p.c., otra rata fue tratada a los 12 días, mientras que tres ratas fueron intervenidas a los 15 d.p.c. También se utilizó una rata para ser transducida intravenosamente (i.v.), al mismo tiempo que se realizaban las transducciones intra-amnióticas (i.a.).

El grupo de transducción i.v. estuvo constituido por 21 ratas distribuidas de la siguiente manera:

- 10 ratas fueron transducidas a los 12 d.p.c.
- 10 ratas fueron transducidas a los 15 d.p.c.
- Una rata fue transducida para reemplazar a alguna rata de cualquiera de los grupos que muriera por efectos de la carga viral.

El grupo de transducción i.a. estuvo formado por 17 ratas, las cuales fueron distribuidas en dos grupos:

- 9 ratas fueron transducidas a las 12 d.p.c.
- 8 ratas fueron transducidas a los 15 d.p.c.

- **Tres ratas (controles negativos para ambas transducciones) permanecieron sin realizarles ningún tipo de transducción, dejando que el período gestacional llegara a término. Éstas fueron colocadas en cajas separadas sin ser perturbadas hasta el día del parto.**

A la mañana siguiente del parto, los recién nacidos fueron observados y valorados para determinar la presencia de malformaciones espontáneas. Las extremidades anteriores posteriores, las estructuras faciales y la linealidad en la cola presentaron patrones normales de desarrollo. No se observaron variaciones considerables en pesos y medidas con respecto a los determinados en las transducciones intravenosas, aunque sí fue el caso entre los diferentes grupos transducidos de manera i.a.

VI.II. Laparotomía exploratoria (estudio piloto con una rata).

El proceso quirúrgico fue realizado en una rata gestante de 17 d.p.c. con los siguientes propósitos:

- 1) **Saber si la rata sobrevivía el proceso quirúrgico.**
- 2) **Conocer tanto la distribución, morfología y posición de los fetos en el cuerno uterino.**
- 3) **Establecer si el calibre de la aguja utilizada causaba algún daño y por tanto alteración en el equilibrio osmótico del líquido amniótico, así como también,**
- 4) **Establecer las condiciones idóneas para los procesos transduccionales posteriores.**

La rata gestante permaneció anestesiada por espacio de dos horas (tiempo medido desde la ausencia total de movimiento hasta la detección de reflejo pupilar y movimiento letárgico restringido), tiempo suficiente para permitir la realización del proceso quirúrgico. Se realizó la inyección de cinco fetos de un total de diez. Se inyectaron un total de 100 μ l por feto de una mezcla de solución.

salina y rojo neutro (10:1). Las inyecciones realizadas fueron exitosas ya que se pudo comprobar que el saco amniótico era capaz de recibir un volumen considerable de líquido. Sin embargo, tres de los cinco fetos evidenciaron algunas vesículas hemorrágicas, lo que sugirió que una disminución en el volumen a inyectar daría mejores resultados. Al día siguiente la rata mostraba pelo eréctil y letargia, pero sin complicaciones aparentes al proceso quirúrgico. Pasados tres días, la rata fue sacrificada, siendo los fetos liberados del cuerno uterino y de sus sacos amnióticos respectivos. Dos fetos mostraban daño por la punción realizada. Un feto poseía un orificio localizado en el dorso en su porción superior y el segundo presentaba un proceso necrótico a nivel de la cola y pata derecha. El resto de los fetos inyectados fueron encontrados normales y sin ninguna alteración aparente. Todos los fetos mostraron movimiento antes de ser extraídos de sus sacos amnióticos (Figuras 8 y 9).

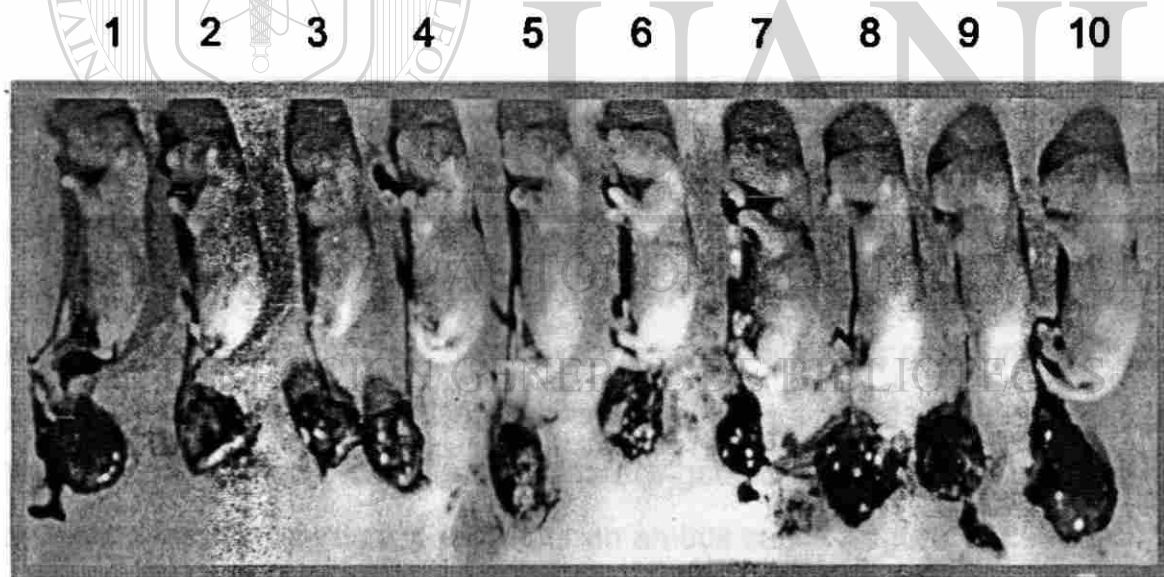


Figura 8. Fetos extraídos de los cuernos uterinos a los 20 d.p.c. (punción realizada a los 16 días de gestación). Inyección de 100 μ L de solución salina: Rojo neutro (10:1) a los fetos 1, 2, 3, 5 y 7), una vez realizado el proceso de laparotomía y su liberación de sus respectivos sacos vitelinos. La fotografía muestra también las placentas y los cordones umbilicales completos.

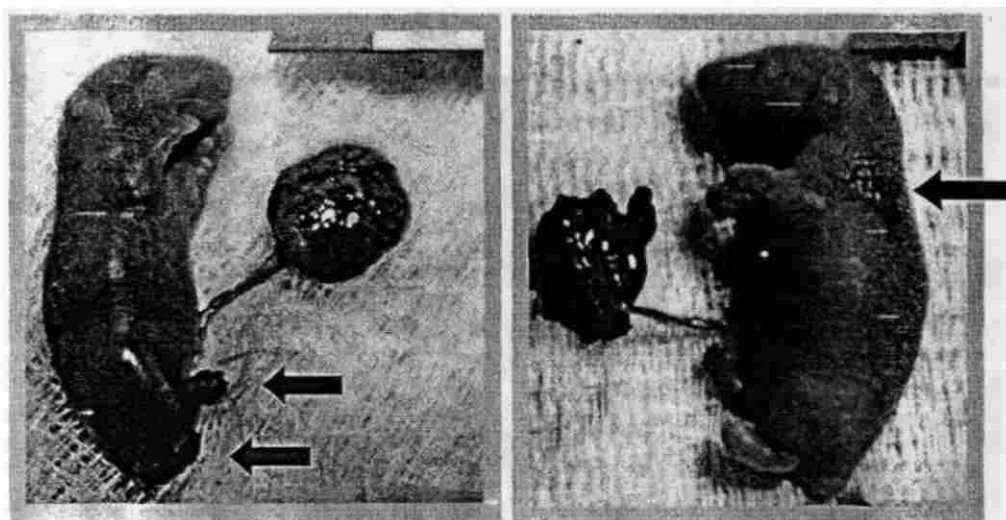


Figura 9. Fetos con anomalías en el estudio piloto. El feto de la izquierda (feto 1 de la figura anterior) presenta necrosis de la extremidad posterior derecha y la cola. El otro feto (feto 7 de la figura anterior) muestra una herida punzante en la unión del cuello y el dorso con inflamación y necrosis.

VI.III. Escalamiento de dosis virales.

Este grupo estuvo integrado por 6 ratas. La primera rata fue transducida a los 9 d.p.c. A esta rata le fue administrada una carga viral de 1×10^{10} p.v. por cada embrión transducido. Se transdujeron diez embriones con la misma carga viral y a cuatro embriones en el cuerno uterino del lado opuesto (controles) se les administró una mezcla de solución salina y rojo de fenol (10:1). Las transducciones fueron realizadas de manera tangencial y tratando de que el vector adenoviral entrara en uno de los flancos más alejados al embrión con una aguja calibre 28. La rata falleció horas más tarde. Los órganos de la madre y los embriones fueron extraídos y teñidos para β -galactosidasa con la finalidad de observar la distribución tisular del vector en ambos casos (Figura 10).

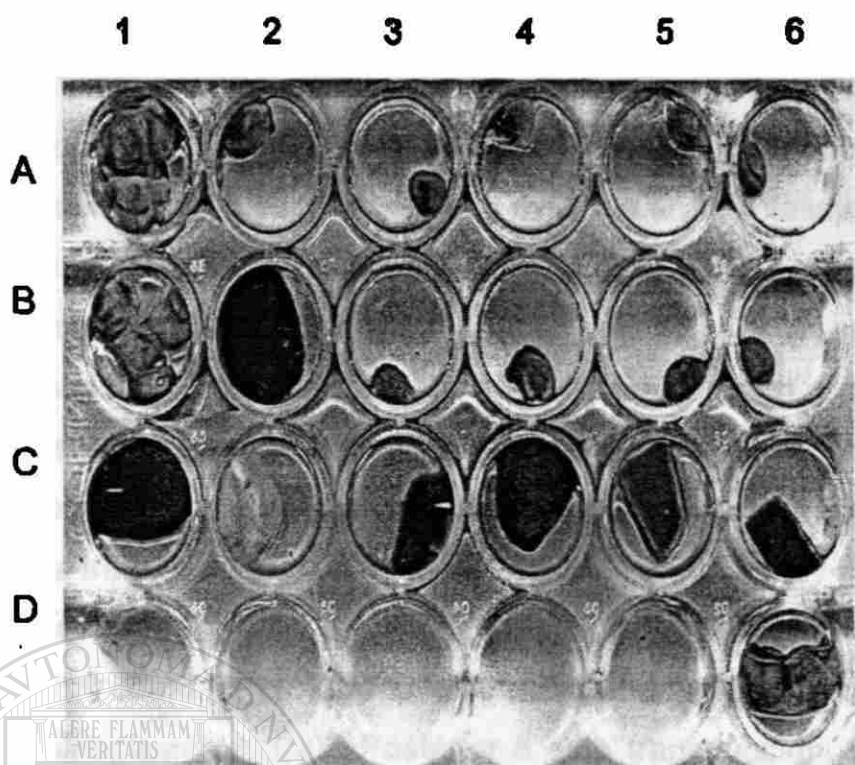


Figura 10. Órganos maternos y de embriones transducidos con el vector AdLacZ. A1 y B1. Cuerno uterino al cual le fueron removidos los embriones. A2-6 y B3-6. Embriones liberados del cuerno uterino y sacos vitelinos respectivos. B2. Corte sagital de riñón materno. C1. Porción media del bazo. C2. Corte sagital de cerebro. C3 Pulmón izquierdo. C4 Corte sagital de corazón. C5 y C6 Cortes aleatorios de porciones del hígado. D6. Embriones transducidos aún dentro del cuerno uterino.

Varios órganos de la madre (riñón, hígado y bazo) mostraron coloración azul. Los embriones del cuerno que fue transducido fueron conservados en tinción por más de tres días, pero no desarrollaron una coloración aparente. A pesar que no se evidenció un color para el vector utilizado, el análisis histológico reveló que 7 de los 10 embriones transducidos fueron positivos para la tinción con β -galactosidasa. El análisis histológico para el embrión mostró que el vector está localizado básicamente en la zona de transducción y de manera escasa en otros órganos.

Los resultados del análisis histológico para los órganos maternos evidenciaron un comportamiento igual al observado macroscópicamente. El cuerno uterino fue transducido de manera intensa, mientras el corazón y la

placenta mostraron negatividad para el vector. Ninguno de los órganos macroscópicamente negativos para la tinción de β -galactosidasa fue positivo en el estudio histopatológico. El riñón se encontró transducido en el epitelio de los túbulos proximales, siendo esta tinción muy evidente en citoplasma y núcleo. El hígado mostró transducción en los hepatocitos de los centros lobulillares, tanto en el citoplasma como en la membrana. Los colangioloos fueron positivos en el citoplasma. En el bazo se observó un alto nivel de transducción con la presencia de macrófagos. La presencia de macrófagos no fue exclusiva del bazo, pues también se observó en los pulmones, en el epitelio bronquial y en los bronquiolos. La transducción en el encéfalo fue abundante y muy diversa, sobre todo en las neuronas. El vector fue encontrado en las células de Purkinje (tanto en el citoplasma, como en el núcleo), en células endoteliales y en el conducto ependimario (citoplasma apical). Posterior a esta transducción, se realizaron otras tres transducciones a dosis decrecientes, hasta un valor de 1×10^8 p.v. totales. En ninguna de ellas se logró que la rata sobreviviera a la laparotomía.

La segunda, tercera y cuarta rata fueron transducidas a los 15 d.p.c. con cargas virales de 1×10^{10} , 1×10^9 y 1×10^8 p.v. totales por embrión transducido. Se transdujeron un total de 12 embriones y una cuantía igual fungieron como controles. Los 39 embriones restantes no fueron transducidos. Los resultados para los órganos maternos mostraron un comportamiento similar a aquellos observados para la rata transducida al noveno d.p.c. Estas ratas, a diferencia de las primeras, sobrevivieron el proceso quirúrgico y sólo mostraron letargia y pelo eréctil, sin variación en la temperatura corporal el día posterior a la realización de la operación y hasta el día de su sacrificio. El análisis histológico de los embriones mostró una transducción muy particular. El vector se encontró en la piel y dermis, en la región bucal, en el epitelio nasal, epitelio nasofaríngeo y escasamente en el epitelio bronquial. También, se registró que los fetos presentaron transducción en el intestino delgado medio, siendo muy evidente en las zonas cercanas a los procesos de descamación (tinción intracitoplasmática y nuclear).

Acorde con los resultados obtenidos en las trasducciones al 9 d.p.c., se decidió que a la quinta rata transducida a los 12 d.p.c. se le administraría una carga viral de 1×10^8 p.v. totales por embrión transducido. Sólo cuatro embriones fueron inyectados de un total de 12, dos con vector y dos con solución salina. Sin embargo la rata no sobrevivió el proceso quirúrgico. De igual manera los embriones y los órganos de la madre fueron procesados tanto para la tinción de β -galactosidasa, como para el análisis histológico. Los resultados de ambos análisis son muy similares a los obtenidos para las ratas transducidas a los 15 d.p.c., pero en este caso los embriones sólo muestran transducción en la zona aledaña al sitio de punción.

La sexta rata transducida de manera intravenosa, recibió una dosis única de 1×10^{11} p.v. totales a los 12 d.p.c. Una vez cumplidos los 15 d.p.c., la rata fue sacrificada. Se obtuvieron un total de 13 embriones todos normales y sin ninguna malformación aparente. Tanto los embriones como los órganos de la madre fueron sometidos al proceso de tinción para el vector. Los embriones fueron liberados del cuerno uterino y de sus sacos y sólo algunos fueron mantenidos dentro de ellos para exponerlos a la tinción. Ningún embrión mostró una coloración en sistema tegumentario externo.

Los resultados de los embriones que fueron mantenidos en sus sacos amnióticos mostraron coloración en la parte radial a la placenta del saco amniótico, pero esta última no desarrolló una coloración para el vector (Figura 11). El análisis histológico reveló que el único tejido transducido fue el intestino delgado medio en el embrión. Los órganos de la madre por su parte muestran grados de transducción de intensidad decreciente (tinción citoplasmática y nuclear) en cuernos uterinos, riñones, bazo, hígado y cerebro.

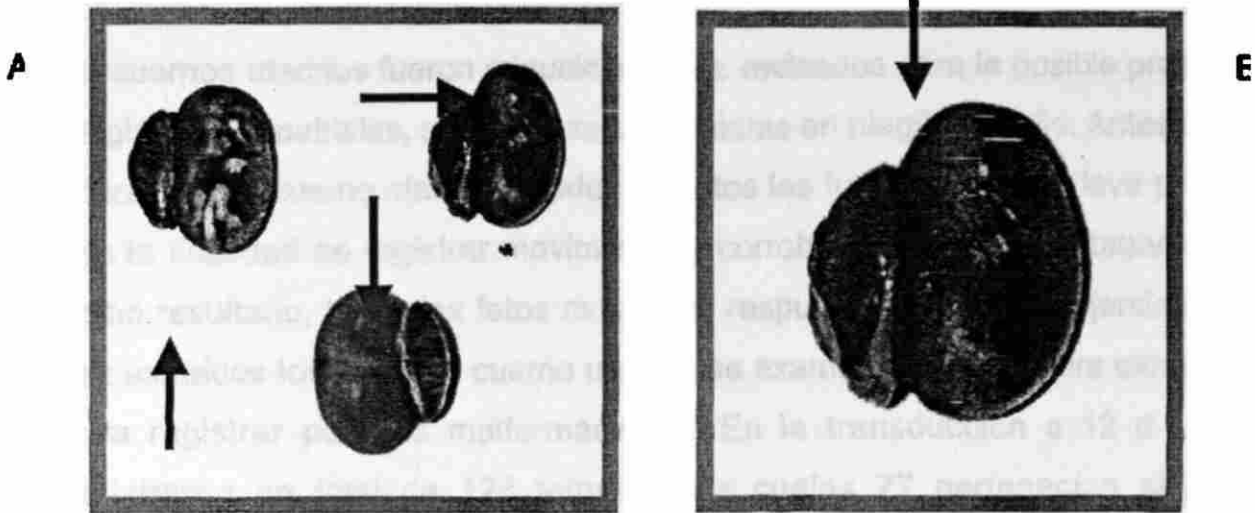


Figura 11. Análisis de la transducción intravenosa para β -galactosidasa, realizada a los 12 d.p.c. con 1×10^{11} p.v. totales. Embriones de 15 d.p.c. que permanecen en sus sacos vitelinos. A. Las flechas indican la presencia del vector cuya distribución es siempre radial a la placenta. B. Magnificación de uno de los fetos en fotografía. A.

VI.IV. Estudios de transducción y toxicidad materno-fetal.

VI.IV.I. Transducción Intravenosa (i.v.).

De cada transducción intravenosa, se designaron 5 ratas para ser transducidas con el vector adenoviral y las 5 restantes fueron controles del estudio. Tanto estas ratas como las destinadas para la transducción intra-amniótica tenían alrededor de tres meses de edad y sólo hubo una variación de tres meses y medio con aquellas que fueron preñadas y mantenidas sin manipulación hasta el final del estudio (3 ratas, controles externos).

El vector adenoviral fue inyectado mediante punción única en la vena caudal de la cola de la rata, siendo administrados 100 μ l de vector y 100 μ l de solución salina a los controles. Se utilizó éter como agente sedante. Sólo tres ratas presentaron una alteración en su comportamiento, registrándose pelo eréctil 24 horas después de la transducción. Ninguna rata presentó letargia o alteración en la temperatura pasadas 48 hrs de la transducción.

Una vez sacrificadas, los cuernos uterinos exhibieron una coloración normal y ninguno de ellos presentó reabsorción parcial o total de fetos. Todos

los cuernos uterinos fueron minuciosamente revisados para la posible presencia de glándulas metriales, sin ser observadas éstas en ningún estadio. Antes de ser liberados del cuerno uterino, a todos los fetos les fue ejercida una leve presión, con la finalidad de registrar movimiento y corroborar que estos estaban vivos; como resultado, todos los fetos mostraron respuesta al estímulo ejercido. Una vez extraídos los fetos del cuerno uterino, se examinaron de manera exhaustiva para registrar posibles malformaciones. En la transducción a 12 d.p.c. se registraron un total de 128 fetos de los cuales 77 pertenecían al grupo transducido y 51 al grupo control. En la transducción a 15 d.p.c. se registraron un total de 120 fetos, 60 del grupo transducido y 60 del grupo control.

En el análisis macroscópico todos los fetos mostraron una distribución normal de sus órganos externos. Las extremidades posteriores y anteriores poseían digitaciones completas, movimientos rotacionales normales y ángulos posturales también de carácter normal. Las estructuras faciales (proporciones de comisuras nasales y bucales) también fueron normales, así como la curvatura de la espina dorsal. La cola de todos los fetos mantuvo su carácter lineal y la relación cuerpo: cabeza (1:3) se mantuvo dentro de los estándares normales, sin variaciones considerables. De igual manera, todos los fetos fueron medidos, pesados y colocados posteriormente en cajas de Petri conteniendo formaldehído al 10%. Una vez cumplidas las 24 horas fueron examinados por segunda vez por el patólogo quien corroboró los resultados.

VI.IV.I.I. Análisis anatomopatológico.

VI.IV.I.I.I. Hallazgos de transducción viral en la madre.

El análisis anatomopatológico en las madres evidenció transducción en todos los órganos disectados. El mayor grado de transducción con el vector adenoviral se registró en ambos riñones, principalmente en los túbulos contorneados proximales. A éstos, le siguió el bazo, mostrando una migración del vector de la zona basal a la zona apical. En el hígado, el vector transdujo

casi todas las estructuras hepáticas como: sinusoides hepáticos, hepatocitos, región centro lobulillar, triada portal y conductillos biliares. El cuerno uterino presentó un grado de transducción considerable y fue observado en todos los cortes analizados de las ratas que fueron transducidas. El cerebro mostró una transducción inusual, aunque muy leve, de los plexos coroideos, meninges y neuronas. Los pulmones también evidencian transducción en tejido bronquial y alveolar con una demarcación de macrófagos. No existió una diferencia significativa en el patrón de transducción para los dos diferentes estadios de transducción.

VI.IV.I.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos.

De un total de 248 fetos, el 42.26% fueron hembras, 40.24% fueron machos y al 17.47% no se les identificó tejido de líneas germinales. El sexo de los fetos fue determinado por la presencia de testículos (Figura 12).

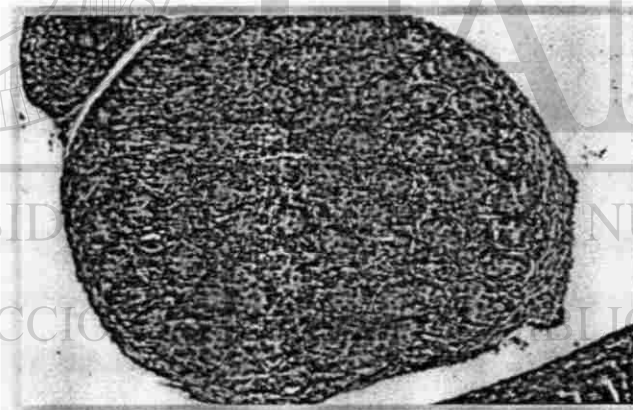


Figura 12. Testículos normales de feto a los 19 d.p.c. Tinción H/E (40X). La ausencia o presencia de esta glándula fue el criterio base para la determinación del sexo en los embriones.

En las madres transducidas el vector pasó la barrera placentaria y se observó intensa transducción del intestino delgado de los fetos, la cual se demuestra desde las capas basales hasta la luz del intestino (Figura 13).

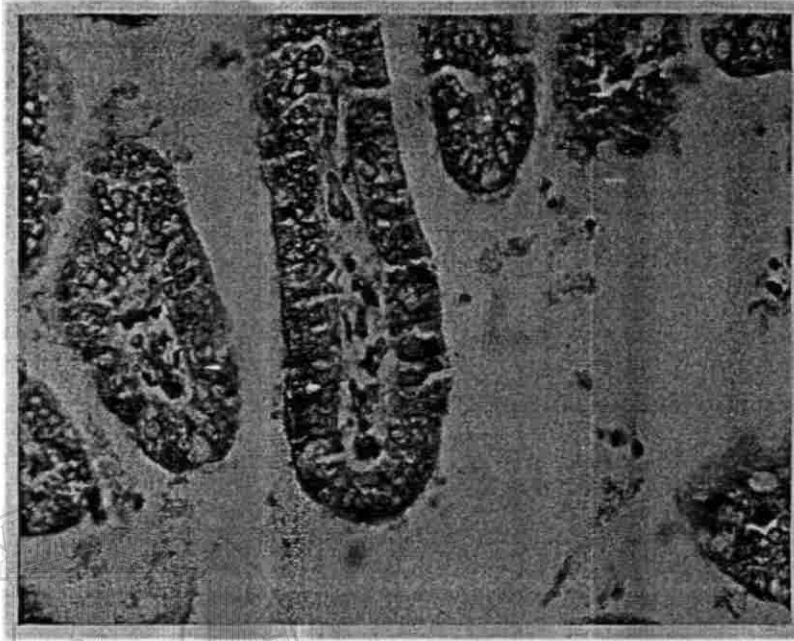


Figura 13. Intestino delgado de feto a los 19 d.p.c. transducido vía i.v. Tinción X-gal (60X). La distribución del vector esta demarcada principalmente en tejido de la zona basal.

Ningún otro órgano del feto exhibió transducción cuando fue analizado por la tinción para detección de β -galactosidasa. La tinción leve del cordón umbilical en dos fetos, no fue observada en estadios tardíos. La membrana amniótica conservó su positividad tanto para la transducción a 12 días como a 15 días. Un 85% a un 90% de los fetos transducidos analizados mostraron transducción adenoviral (figura 14).

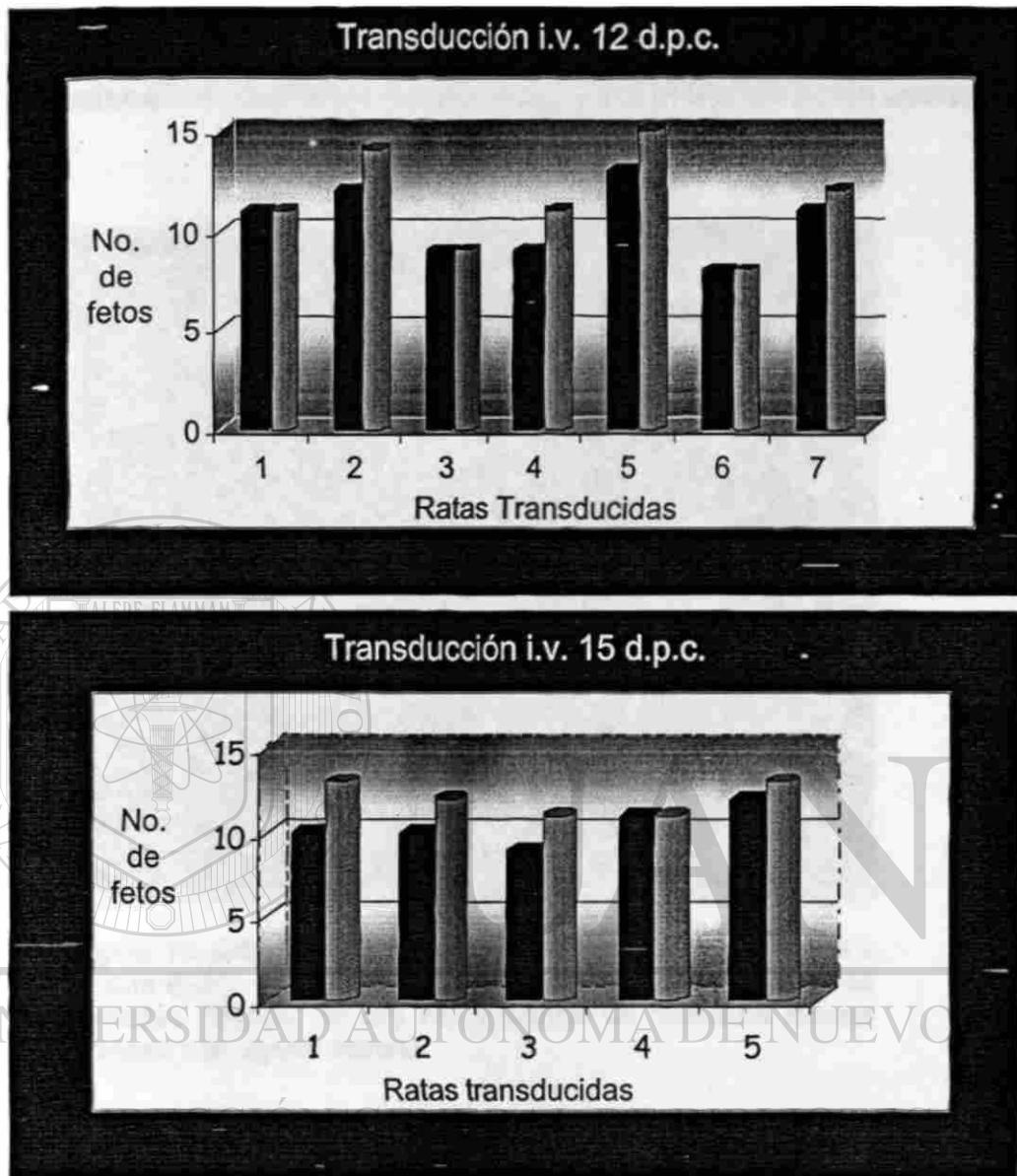


Figura 14. Comparación de la eficiencia de transducción fetal. Fetos que evidenciaron presencia del vector (barras azules) versus el número total de fetos transducidos (barras anaranjadas). Eficacia de transducción 85-90%.

La tinción con hematoxilina y eosina evidenció normalidad para el intestino delgado en todos los cortes analizados, sin alteraciones patológicas de ninguna índole. En tres fetos, sin embargo, se encontraron abundantes linfocitos en la glándula suprarrenal y en un feto se encontraron signos de metaplasia escamosa intestinal (Figura 15). Así mismo, se detectó la presencia de bacteria en el espacio subepidérmico en 5 fetos analizados (Figura 16). El análisis

inmunohistoquímico sin embargo, no revela la presencia del vector adenoviral en dichas estructuras. La presencia de linfocitos en glándulas suprarrenales sólo estuvo asociada a la presencia de bacteria en fetos contiguos de una sola rata. La Tabla 8 resume los resultados encontrados para la transducción adenoviral.

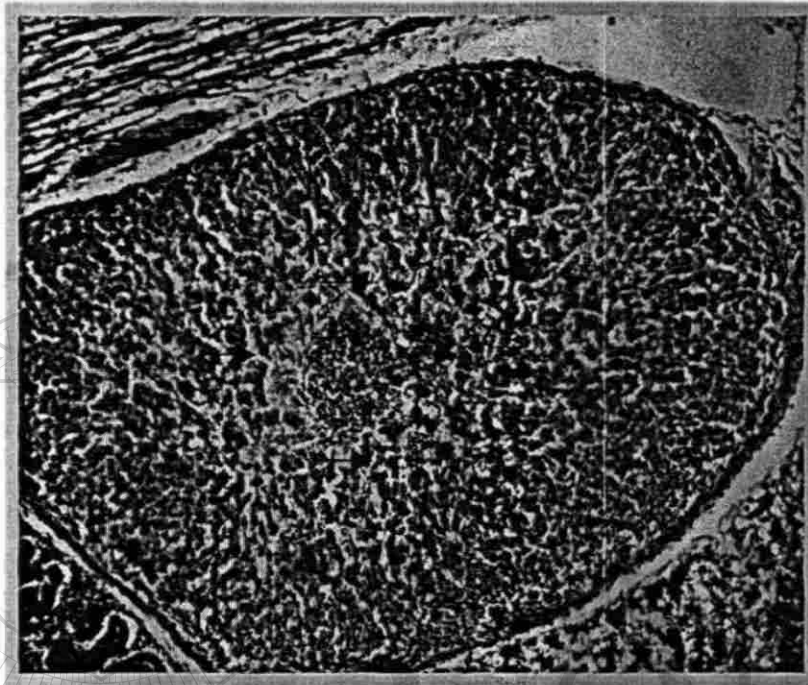


Figura 15. Glándula suprarrenal fetal. Tinción de hematoxilina y eosina (60X). Transducción i.v. a los 15 d.p.c. La presencia de linfocitos (flechas) es una consecuencia de respuesta inmune primaria a un agente extraño.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

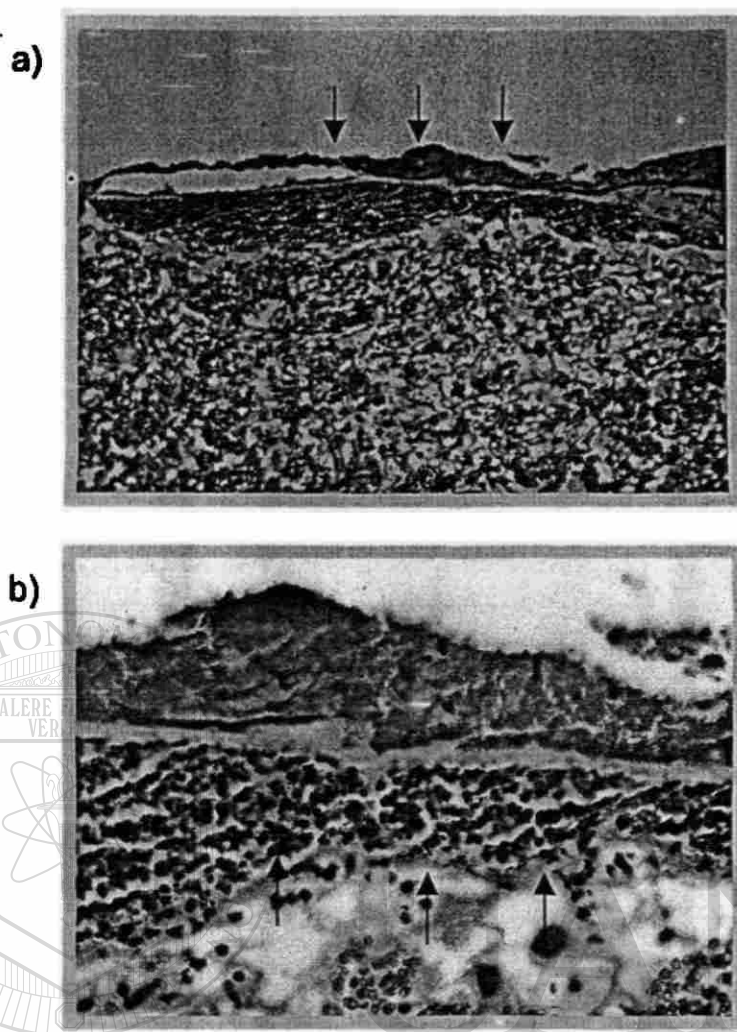


Figura 16. Piel. Tinción H/E. a) Se observan bacteria en el espacio subepidérmico de los fetos transducidos vía i.v. (flechas) (20X). b) Amplificación del área en A. El puntillito denota la presencia de linfocitos (flechas) (40X).

Tabla 8. Hallazgos en la transducción i.v.

Ejemplares analizados	Órgano o estructura corporal	Hallazgos	
		Casos n=10	Controles n=10
Madres	Bazo	+++	-
	Cerebro	++	-
	Pulmón	+	-
	Hígado	++	-
	Riñón	++++	-
	Ovario	-	-
	Cuerno Uterino	++++	-
	Fetos	n=137	n=111
Fetos	Placenta	-	-
	Cordón Umbilical	+	-
	Membrana Amniótica	+++	-
	Intestino	++++	-
	Retroperitoneo	-	-
	Pulmón	-	-
	Hígado	-	-
	Piel	-	-
	Glándula suprarrenal	-	-

Escala de transducción (T):

(-) Negativo, (+) T. Leve, (++) T. Moderada, (+++) T. Severa, (++++) T. General.

VI.IV.II. Transducción Intra-amniótica.

De la misma manera que en el grupo de transducción intravenosa, se consideró la posibilidad de que algunas de las ratas fallecieran debido al proceso quirúrgico o a la carga viral administrada. Por tal razón, los grupos fueron extendidos en número hasta 9 y 8 ratas respectivamente.

En la transducción a los 12 d.p.c. no todas las ratas sobrevivieron el proceso quirúrgico. De un total de 9 ratas, 5 sobrevivieron el proceso de laparotomía (55%). Como se había observado en el estudio de escalamiento viral, las ratas a estadios tempranos fallecían antes de las 24 horas de la transducción. Para esta transducción se decidió minimizar el número de embriones inyectados al punto en el cual se registraran el máximo de transducciones sin causar la muerte de la madre. Esto significó, hacer un máximo de tres transducciones por rata, con dos del grupo experimental y una sola del grupo control. De un total de 86 embriones, 8 embriones fueron inyectados con solución salina (controles) y 18 fueron transducidos con el vector

viral. De los 18 embriones transducidos, 12 fetos fueron recuperados de madres que sobrevivieron el proceso quirúrgico (66%), mientras que los restantes 6 fetos (33%) se recuperaron de ratas muertas en las subsecuentes 24 horas. Por su parte, los embriones que sirvieron como controles, estuvieron distribuidos equivalentemente en ambos grupos (ratas vivas y ratas muertas). Sólo una rata murió en el proceso quirúrgico sin llegar a completarse la transducción de sus 3 embriones. Por esta razón, sus órganos no fueron procesados para el análisis histopatológico.

Durante la obtención de los fetos se encontraron glándulas metriales en los cuernos uterinos y un elevado índice de fetos macerados y reabsorbidos (12 fetos), así como fetos muertos (5 fetos). A continuación se agrupan los datos antes mencionados (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen de hallazgos en fetos transducidos.

Estado de los fetos	No. de fetos	Porcentaje de la transducción	Estadio de transducción (d.p.c.)	Características
Malformados	6	16.6	15	2 en cola (8.3%), 2 en extremidades inferiores (8.3%)
Compresión fetal	4	16.6	15	Compresión moderada a severa
Muertos	8	66	12	Inflamación y retención de líquidos
Macerado	2	16	12	Extremidades inferiores
Reabsorbido	19	45.23	12	Parcial a total

Transducción	Ratas preñadas	Fetos 12 d.p.c.			Fetos 15 d.p.c.		
		Transducidas	Controles	Totales estudiados	Transducidas	Controles	Totales estudiada:
I.V.	22	77	51	128	60	60	120
I.A.	17	18	8	86	30	23	79

En la transducción a los 15 d.p.c., 6 ratas sobrevivieron el proceso quirúrgico (75%) y dos murieron en las siguientes 24 hrs. (25%). Para este

estadio, de un total de 79 fetos, 30 fueron transducidos (38%) y 23 fungieron como controles (29%). De las ratas que sobrevivieron el proceso quirúrgico se obtuvieron 23 fetos transducidos y 21 controles, mientras que de las ratas muertas se obtuvieron 7 y 2 fetos respectivamente.

En el grupo experimental 12 fetos presentaban maceración con diferentes grados de reabsorción y 6 presentaron malformaciones (Figura 17).

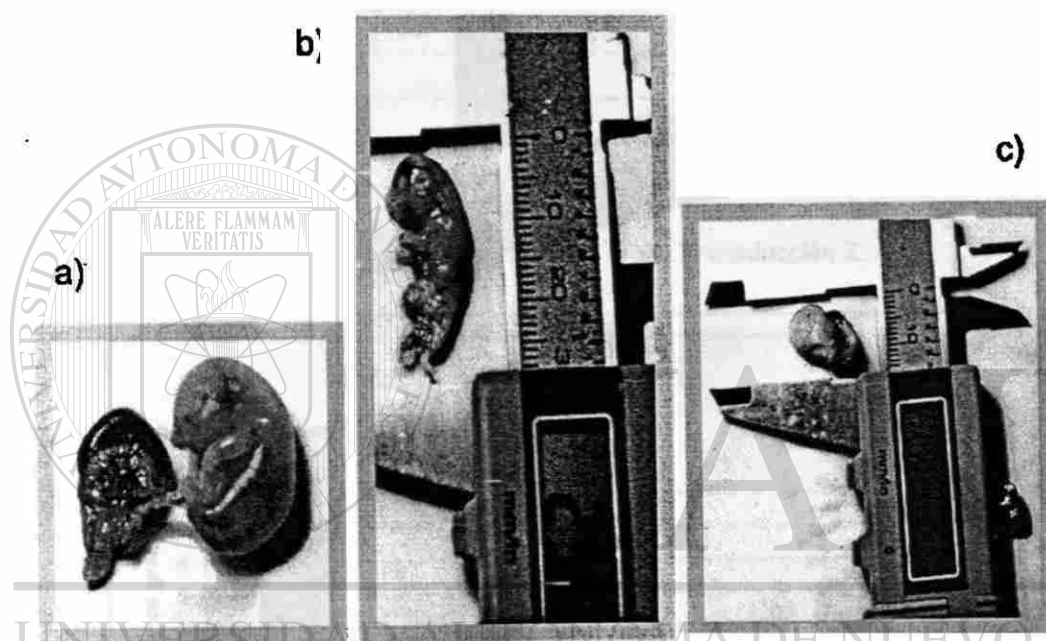


Figura 17. Muerte *in-útero*. a) Caso de muerte in útero. La inflamación y retención de líquidos, indican muerte por varios días con el posterior desarrollo de los procesos de maceración. b) Signos de maceración en extremidades. c) La conclusión del proceso de maceración da inicio a la reabsorción del producto, la cual determinará la presencia de glándulas metriales.

A diferencia del proceso de transducción a 12 d.p.c., la incidencia de mortalidad en las ratas posterior al proceso de transducción fue muy baja y sólo una rata murió debido al proceso quirúrgico. La segunda muerte en este grupo, se debió a un proceso de evisceración. Para evitar esto, en las demás ratas se realizó una segunda ronda de suturación días después al proceso quirúrgico, evitando así la muerte por factores secundarios al proceso de transducción.

Se encontró una variación considerable entre los pesos y medidas registradas para fetos transducidos de manera intravenosa y aquellos de manera intra-amniótica. Los pesos y medidas estuvieron disminuidos en un porcentaje de alrededor de 45% (figura 18 y 19).

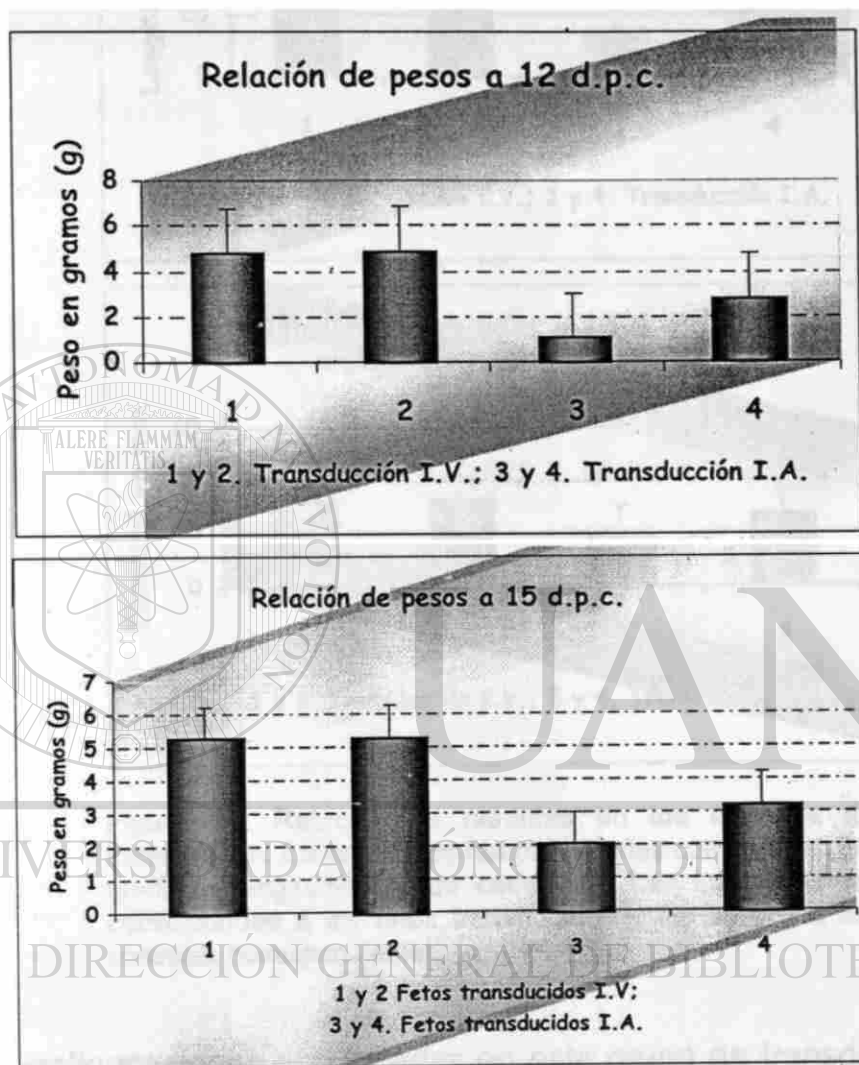


Figura 18. Relación de pesos en los estadios de transducción. Las gráficas comparan de los pesos (g) obtenidos en ambas vías de transducción para los dos estadios manejados en el estudio. Las barras amarillas comprenden los fetos transducidos y las barras verdes a los controles correspondientes.

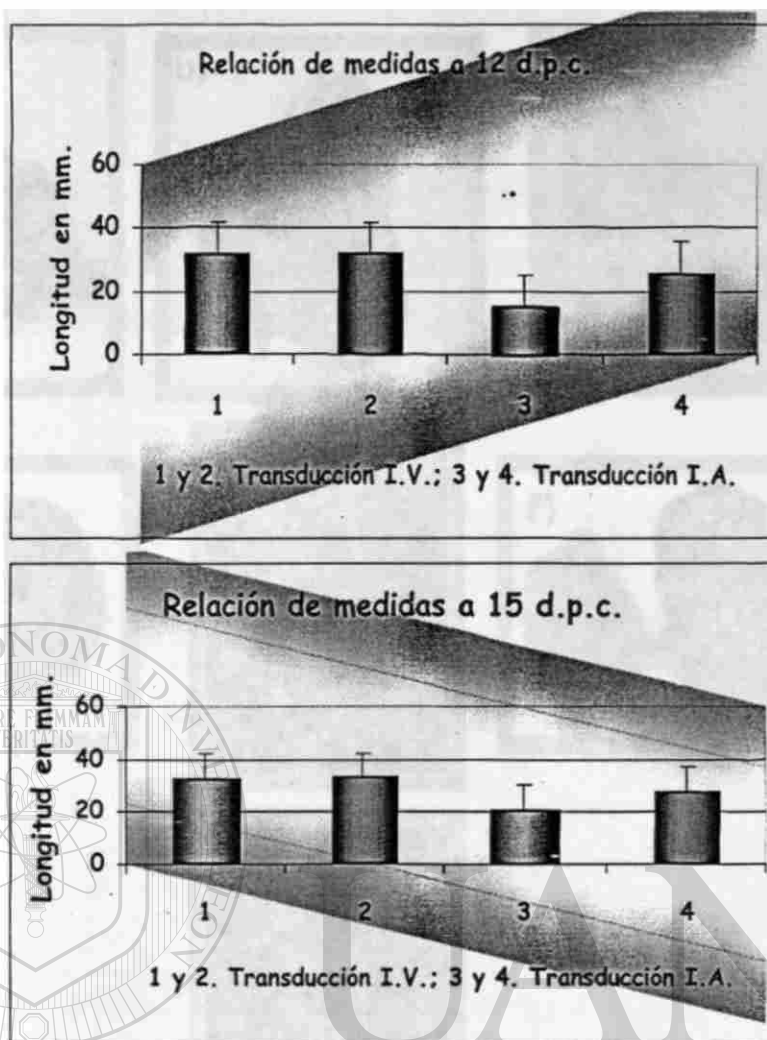


Figura 19. Relación de medidas en los estadios de transducción. Estas gráficas fueron creadas con base en las medidas longitudinales de cada feto. Las barras amarillas corresponden a los fetos transducidos y las verdes a los controles correspondientes.

Las malformaciones encontradas en este grupo de transducción, están representadas principalmente por afecciones de las extremidades posteriores y de la cola (DeMyer y col. 1969; Figura 20). El análisis estadístico de relación de momios realizado para el estudio demostró que no existía una causalidad entre vector adenoviral y algún grado de malformación (RM= 1.03, IC 95% 0.16-6.48).

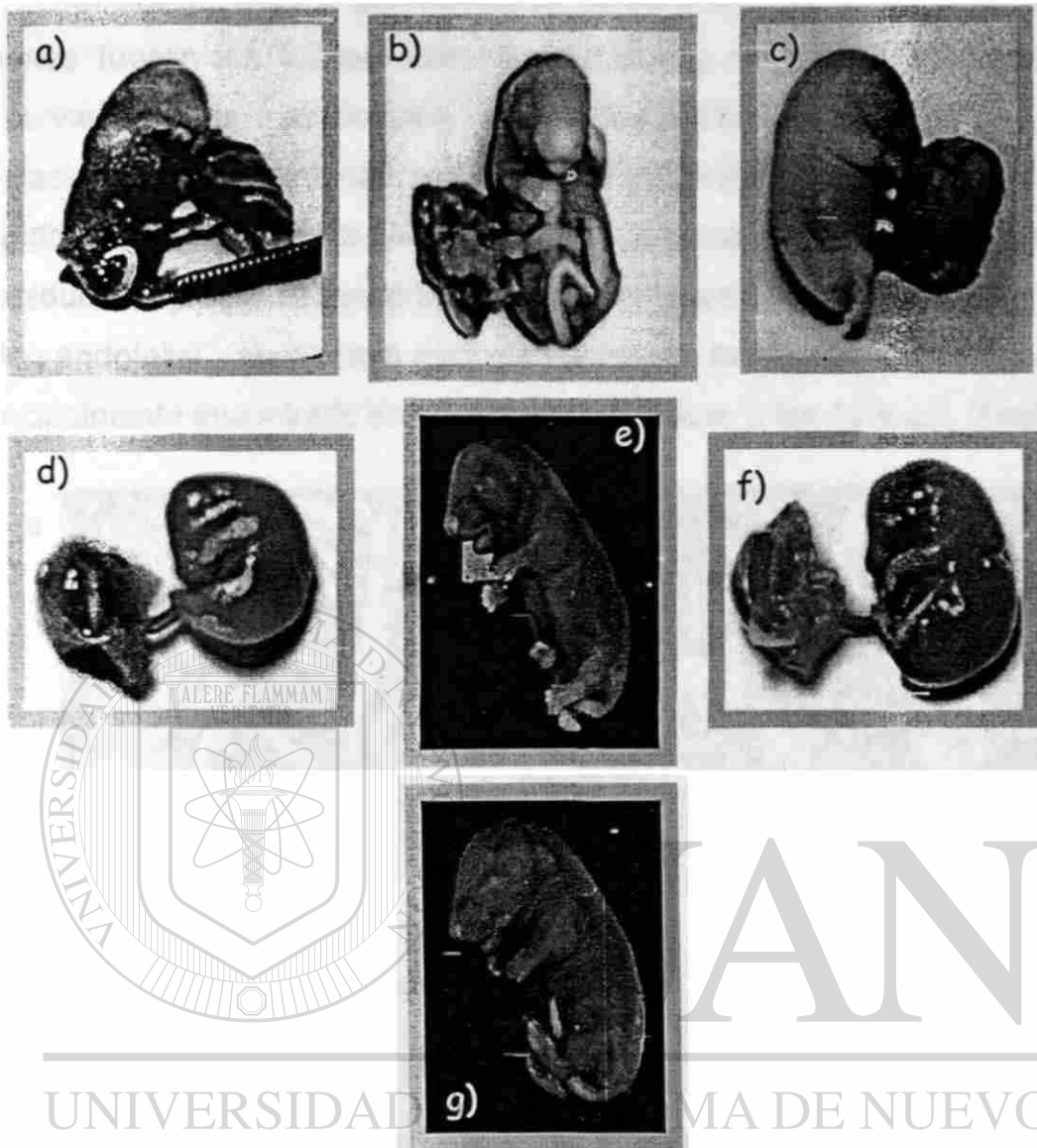


Figura 20. Lesiones en fetos afectados por la transducción i.a. a) Cola superenrollada, b) Cola en gancho, c) Pie equinovaro, d) Compresión severa, e) Pie zambo, f) Compresión y defecto en columna vertebral, g) Normal.

VI.IV.II.I. Análisis anatomopatológico.

VI.IV.II.I.I. Hallazgos de transducción viral en las madres.

En el análisis de los hallazgos de las tinciones con hematoxilina y eosina, todos los órganos (riñones, hígado, bazo, pulmón, cerebro, corazón, ovarios y cuerno uterino) mostraron una anatomía normal, sin daño estructural aparente en todas las laminillas analizadas, tanto para las ratas control, como para aquellas que fueron transducidas con el vector adenoviral.

La tinción para β -galactosidasa mostró los siguientes resultados: los riñones fueron los tejidos más transducidos y semejaron a la distribución observada con la transducción i.v. (túbulos proximales), en ambos estadios gestacionales. El cuerno uterino siempre denotó positividad en los dos diferentes estadios, tanto a nivel de citoplasma como núcleo. El hígado también mostró transducción y ésta estuvo principalmente concentrada en las triadas portales, tejido endotelial y de manera muy esporádica en hepatocitos. Este hallazgo fue principalmente encontrado en las ratas transducidas a los 12 d.p.c. (Figura 21).

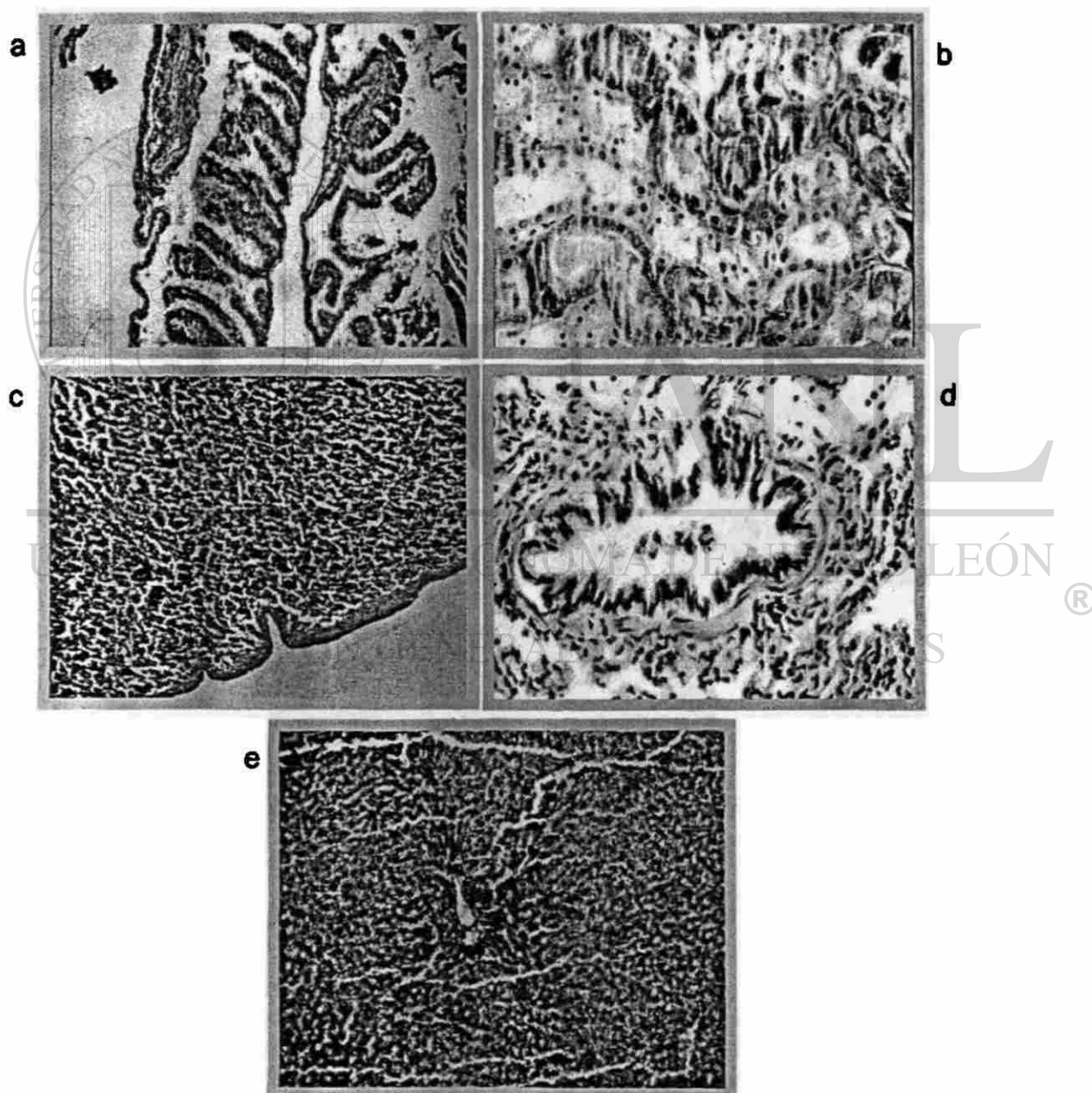


Figura 21. Órganos maternos teñidos con X-gal. Microscopía de luz. La coloración azul denota la presencia del vector adenoviral para las micrografías a, b, c, y d. a) Cuerno Uterino (40X), Riñón (60X), c) Bazo (40X), d) Pulmón (60X). e) Hígado (inmunohistoquímica para adenovirus tipo 5, 40X). El puntilleo café denota la presencia del vector.

El bazo por su parte mostró el mismo patrón de transducción en la zona apical para los dos estadios gestacionales, observándose mayor transducción concentrándose en las ratas tratadas a los 15 d.p.c. (Figura 21). En tejido pulmonar se encontró que el vector estaba localizado en tejido bronquial con la demarcación de macrófagos alveolares (Figura 21).

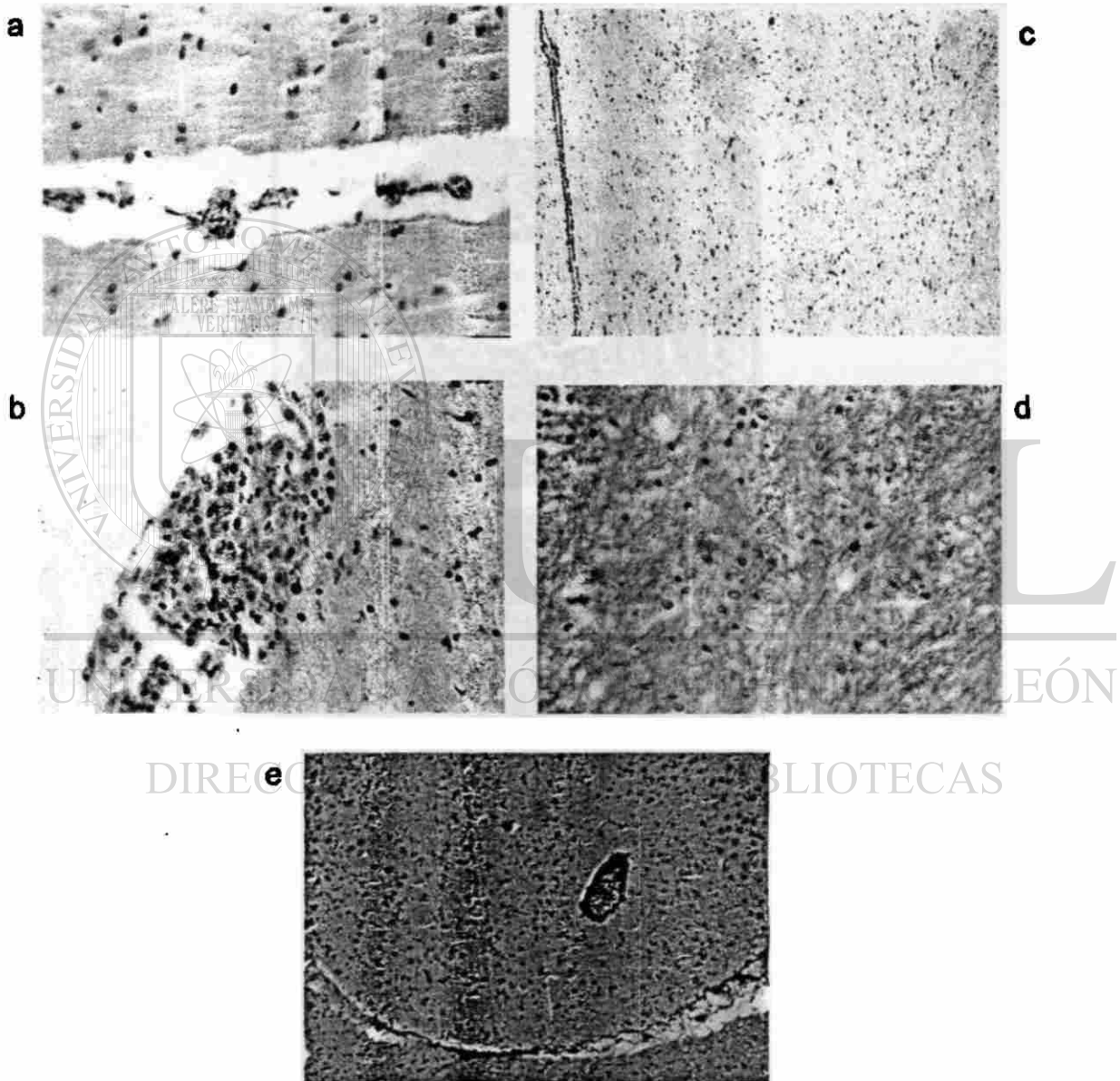


Figura 22. Transducción en cerebro materno (vía i.a.). Tinción X-gal. La coloración azul muestra una distribución amplia del vector adenoviral en varios tipos celulares. a) Meninges, b) Plexos Coroideos, c) Células endoteliales, d) Sustancia blanca. Oligodendrocitos. e) Inmunohistoquímica para adenovirus tipo 5 que ratifica la presencia del vector en plexos coroideos y endotelio.

El análisis para el cerebro demostró transducción en plexos coroideos, células endoteliales y en la luz de los vasos, meninges, células de Purkinje y sustancia blanca. De manera adicional, en la transducción a los 12 d.p.c., el vector se encontró en tejido neuronal (Figura 22). De manera aislada se encontró transducción en líneas germinales de dos ratas, detectada principalmente en el folículo de von Graff, en el cuerpo amarillo y en células luteinizadas. Sólo una rata mostró transducción en un óvulo, células foliculares y células del estroma (Figura 23).

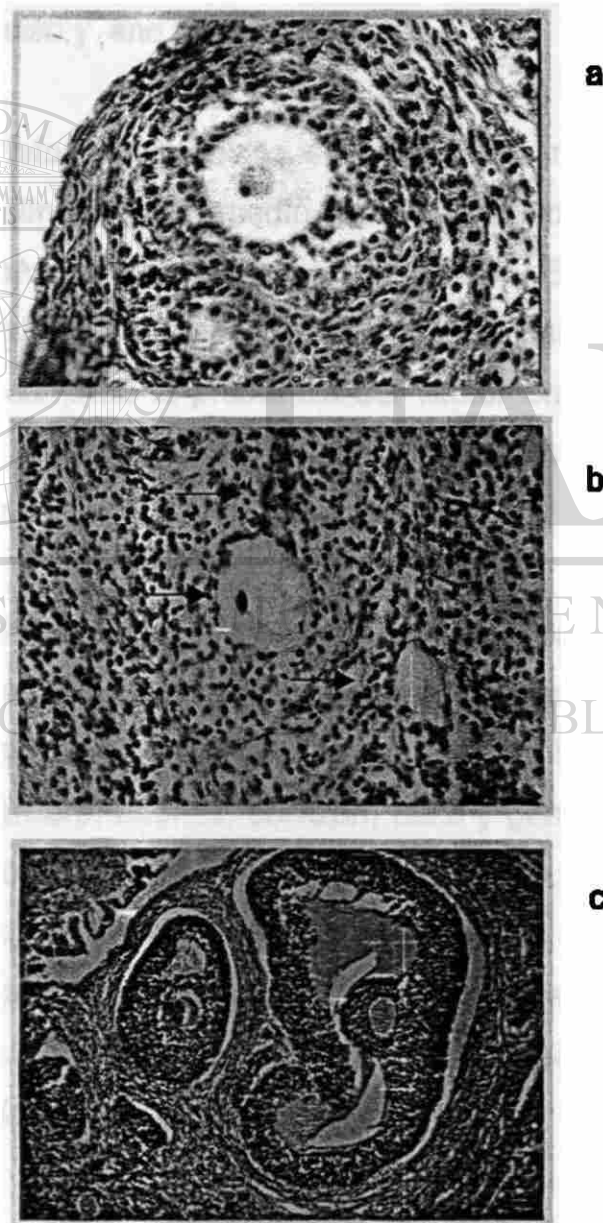


Figura 23. Transducción en ovario materno (vía i.a.). Tinción X-gal y contratinción con rojo rápido nuclear. a) Ovario negativo (60X). b) núcleo óvulo muestra tinción, la cual también se observa en células foliculares y luteinizadas (60X). c) Tinción hematoxilina/eosina. Anatomía normal del tejido germinal (20X).

VI.IV.II.I.II. Hallazgos de transducción viral en los fetos.

Un total de 165 fetos fueron analizados por las tres tinciones. Este total estuvo constituido por un 57.54% hembras, 29.24% machos y en el restante 13.20% de sexo indeterminado.

El análisis microscópico mostró una distribución normal de los órganos internos, con relaciones normales entre ellos, conservando distancias y medidas. No se demostró ningún tipo de obstrucción en los orificios naturales estudiados: boca, orificios nasales, laringe, faringe, tráquea, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. (Figura 24).

En todos los fetos transducidos se observó de manera ubicua vector adenoviral en el intestino delgado medio. Esta transducción se observó desde las capas celulares más basales hasta la luz del mismo. Estos resultados fueron corroborados en el análisis inmunohistoquímico. De la misma manera, el análisis inmunohistoquímico confirmó la presencia del vector en el intestino grueso y ano. (Figura 25). A nivel celular, el vector estuvo distribuido tanto a nivel citoplasmático como nuclear.

La piel, el mesénquima primitivo y el tejido pulmonar fueron transducidos de manera esporádica, observándose tinción en tres fetos transducidos a los 15 d.p.c. El resto de las estructuras fetales dieron un resultado negativo para el vector adenoviral; (cerebro, riñones, corazón, bazo y gónadas). Los resultados en el análisis patológico mostraron signos de inflamación en la placenta (corioamnionitis aguda) en un 13% de los fetos, metritis en un 4% e infección bacteriana en la piel de los fetos en un 78%. Dos fetos presentan inflamación en el cordón umbilical (funcinitis aguda. Figura 26). En la Tabla 10 se resumen los hallazgos para esta vía de transducción.

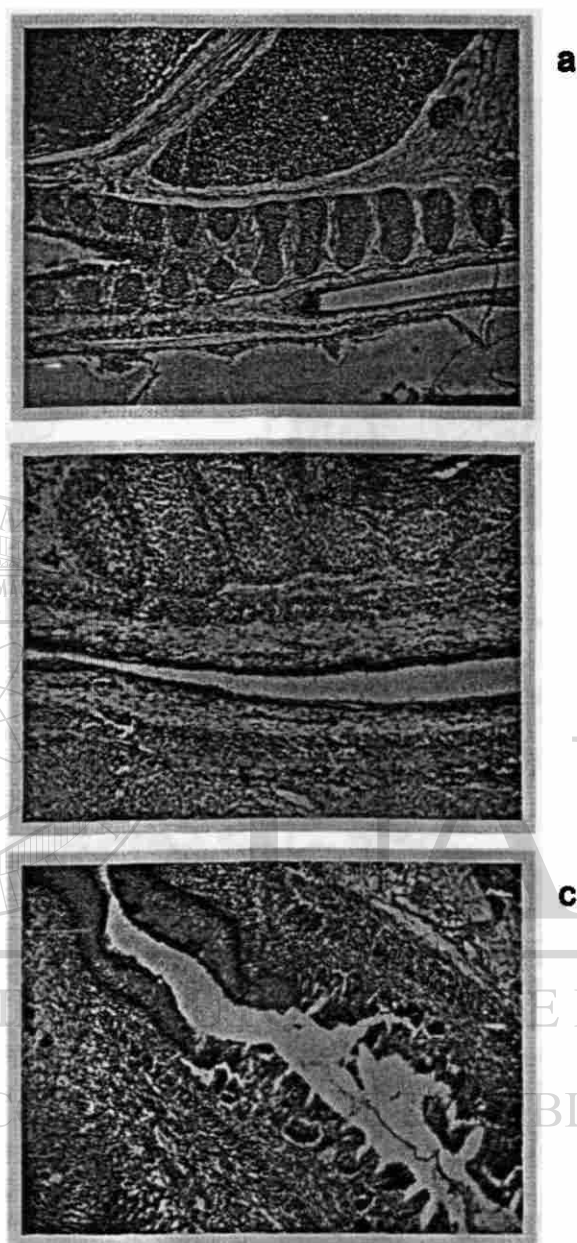


Figura 24. Diversos tejidos fetales teñidos con hematoxilina/eosina (40X). a) Vías respiratorias inferiores con una morfología normal sin obstrucciones y sin rasgos patológicos. b) Corte de vías digestivas. Intestino delgado de constitución normal. c) Áreas de descamación del ano. Las micrografías no muestran signos patológicos.

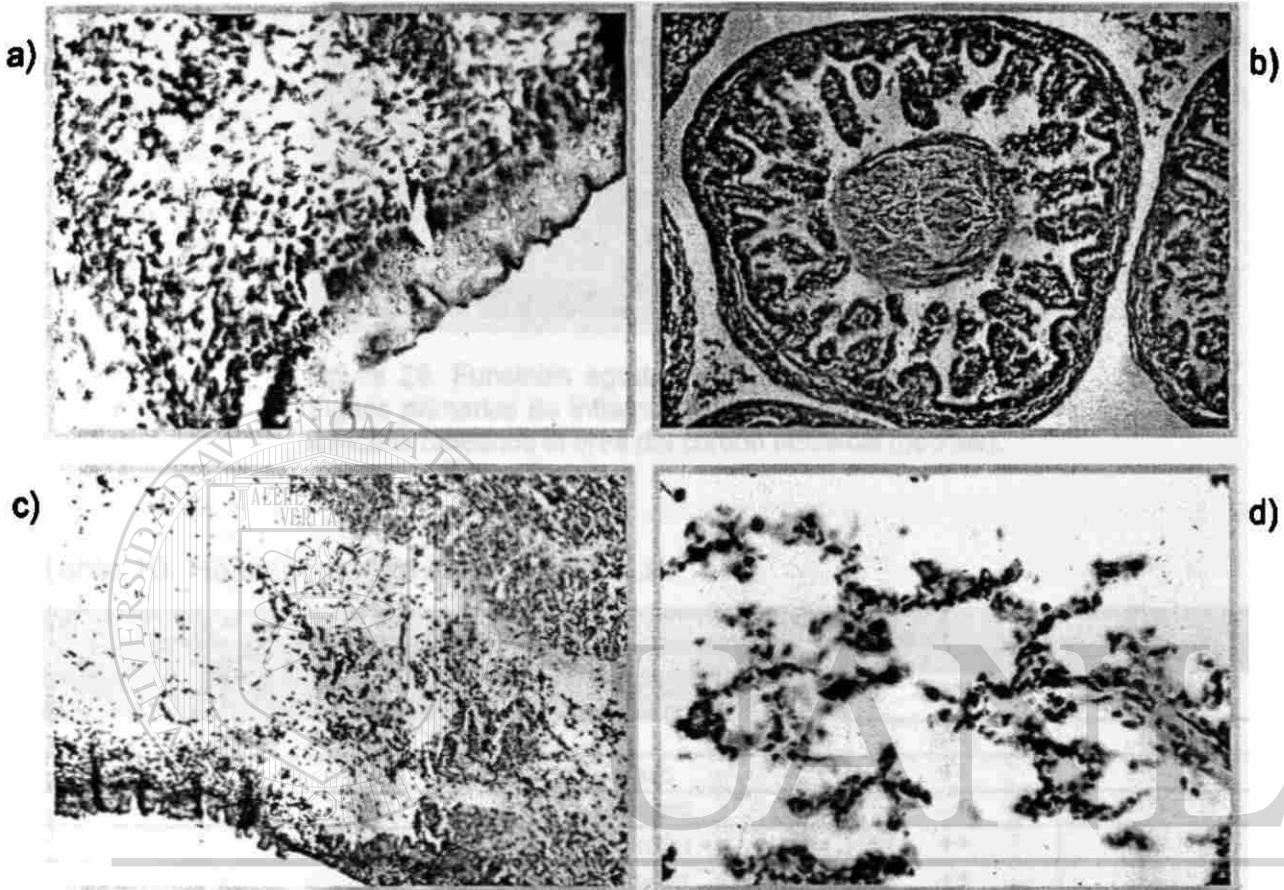


Figura 25. Fetos transducidos i.a. a los 15 d.p.c. Tinción X-gal (azul) contrateñido con rojo rápido nuclear. Microscopía de luz. La distribución del vector adenoviral estuvo representado principalmente en: a) Piel alrededor del área de transducción (60X). b) Intestino delgado cuya distribución fue ubicua en las estructuras de este tejido (60X). c) Mesénquima primitivo. Aunque rara vez fue encontrada la presencia del vector en esta estructura, su localización siempre estuvo ligada al área de transducción (40 X). d) Pulmones. La transducción estuvo localizada principalmente en macrófagos alveolares (60 X).

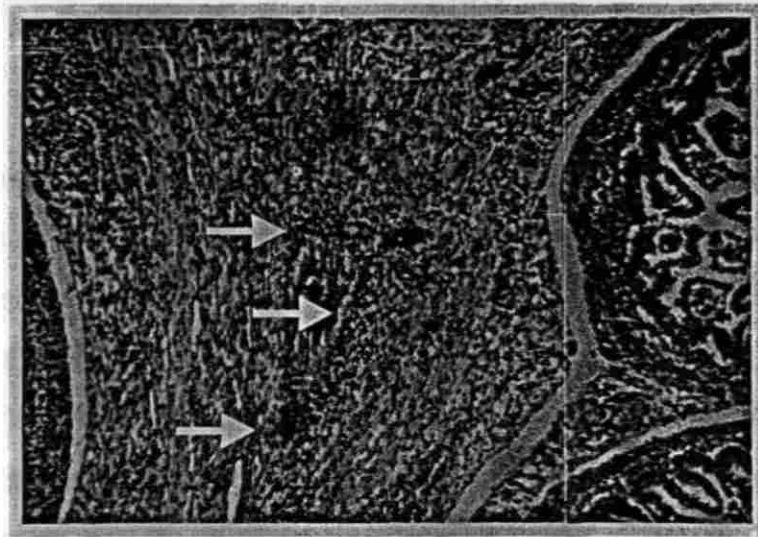


Figura 26. Funcinitis aguda. Hematoxilina y eosina (40X). Signos primarios de inflamación y edema con presencia de linfocitos rodeando el área del cordón umbilical (flechas).

Tabla 10. Hallazgos de la transducción i.a.

Ejemplares Analizados	Órgano o estructura corporal	Hallazgo	
		Casos	Controles
Madres		n=9	n=8
	Bazo	++	-
	Cerebro	+	-
	Pulmón	++	-
	Hígado	++	-
	Riñón	++++	-
	Ovario	+++	-
	Cuerno Uterino	++++	-
Fetos		n=15	n=18
	Placenta	-	-
	Cordón Umbilical	++	-
	Membrana amniótica	+++	-
	Intestino	++++	-
	Retroperitoneo	+++	-
	Pulmón	+++	-
	Hígado	-	-
	Piel	+	-
Glándula suprarrenal	++	-	

Escala de transducción (T): (-) Negativo, (+) T. leve, (++) T. moderada, (+++) T. severa, (++++)
T. general.

VII. DISCUSIÓN

VII.I. Conformación de los grupos experimentales.

Los grupos experimentales variaron de acuerdo a las especificaciones encontradas para protocolos con desarrollo de teratogénesis y efectos toxicológicos (*Baker y cols, 1980*). Estas especificaciones estuvieron basadas en consideraciones histopatológicas y estadísticas. Se establecieron grupos no menores a 10 ratas en el rubro de transducción intravenosa, ya aunados los controles del estudio. En el caso de las transducciones intraamnióticas, se especificó que los cuernos uterinos contrarios sirvieran como controles internos del estudio, de ahí la variación en los números totales de ratas utilizadas para esta transducción, pues el número de fetos a transducir disminuye, debido a la posibilidad de muerte de la madre por una excesiva manipulación. Por esta razón, los números decrecieron hasta en un 50% con respecto a los considerados en las transducciones intravenosas.

VII.II. Estudio piloto.

El estudio piloto reveló que el uso de grandes cantidades de líquido administrado en la cavidad amniótica podía tener las siguientes consecuencias para el embrión:

- 1) La jeringa utilizada poseía un calibre muy grande de aguja, provocando por tanto la fuga de una cantidad considerable de líquido amniótico y de la carga del vector.
- 2) El dejar la aguja dentro del espacio amniótico por un período superior a 20 s disminuyó la fuga de líquido y aumentó la retención del material inyectado. Este proceso es facilitado por la coagulación en el sitio de la lesión.
- 3) La punción en embriones en estadios de 9 y 12 d.p.c; es difícil y poco exitosa. Esto se debe a la baja relación entre la cantidad de líquido amniótico y el tamaño del producto. (*Baker y cols. 1980; DeMyer y*

cols. 1969). La relación del tamaño del producto a la cantidad de líquido amniótico con respecto a los 17 d.p.c. estuvo disminuida en un 75% y 60%, respectivamente (dato obtenido de las observaciones en la laparotomía exploratoria en estos dos estadios). Por esta razón, la punción de embriones de 12 d.p.c. produjo lesiones en la mayoría de los productos tratados, al igual que ocurrió con los embriones de 9 d.p.c. (el tamaño del producto a los 9 días con respecto al espacio que ocupa en líquido amniótico es 9:1).

- 4) En este estudio nunca se logró una transducción exitosa a los 9 d.p.c. bajo ninguna especificación (variación en el número de embriones inyectados, carga viral y cantidad de anestésico empleado en la rata).
- 5) Las administraciones de vector en edades gestacionales de 15 d.p.c. y mayores se lograron exitosamente y resultaron en baja morbilidad y mortalidad fetal.

VII.III. Escalamiento de la dosis viral.

Para el escalamiento de las dosis virales se consideraron los 12 y 15 d.p.c. El escalamiento en las dosis virales nunca produjo la muerte de los embriones a los 15 d.p.c., aún a concentraciones altas (1×10^{11}). La variación en las dosis utilizadas fue tomada de trabajos previos, los cuales ilustran las potenciales alteraciones que pueden ocurrir en la madre y el feto (*Baldwin y cols.* 1997; *Cheng y cols.* 1997; *Douar y cols.* 1997). Estos estudios sostienen que el uso de dosis superiores a las 10^6 partículas virales trae como consecuencia muerte y por supuesto malformaciones en los embriones transducidos (*Jerebtsova y cols.* 2000).

Durante el desarrollo del escalamiento, ninguna rata tratada con las dosis virales que fluctuaron en los rangos de 10^8 hasta 10^{11} reportaron muerte o malformación para transducciones a los 15 d.p.c. Sin embargo, para las transducciones a los 12 d.p.c. los resultados no fueron tan favorables a las mismas dosis. Aunque en este caso se obtuvo un 70% de muerte *in utero*, no se

puede asegurar que la causa de la misma sea el resultado de la carga viral utilizada. La transducción de embriones de rata en estadios tempranos de la gestación con estas cargas virales no ha sido reportada a la fecha. El embrión en este periodo podría ser sumamente vulnerable a cualquier alteración en la cantidad de líquido amniótico, agentes químicos, y por supuesto, a agentes biológicos. La distribución de la transducción en los estadios tempranos de la gestación muestra los mismos patrones a aquellos obtenidos en los períodos tardíos.

La transducción intra-amniótica muestra una intensa transducción del intestino, preferentemente en las células de las capas apicales y alguna o casi nula transducción en el resto de las estructuras.

La transducción intravenosa fue un método accesible y sencillo. Durante todo el estudio, nunca se obtuvo una resistencia al flujo normal en la inyección, confiriéndole un 100% de eficacia y confiabilidad. A la fecha no existe algún estudio donde se establezca un protocolo que determine cargas virales con la finalidad de establecer asociaciones entre malformación y presencia del vector viral administrado por esta vía.

A pesar de que la cantidad de vector utilizada en esta tesis fue baja 1×10^{11} p.v., comparada con las cargas de vector administradas en otros protocolos por vía intravenosa (principalmente protocolos de terapia génica suicida para ratón que reporta 1×10^{12} p.v.t. *Lipshutz y cols 1999*), se pudieron establecer varios patrones de transducción a lo largo de los dos estadios utilizados:

- 1) En órganos maternos, el vector siempre estuvo presente en riñones y en menor cuantía en cuernos uterinos. El bazo presentó una menor transducción aunque también importante.

- 2) A diferencia de otros estudios (*Baldwin y cols 1997; Cheng y cols 1997*), la transducción del hígado no fue notoria, aunque se observó constantemente en las estructuras hepáticas analizadas.
- 3) En el 90% de los casos se observó transducción cerebral, notada principalmente en plexos coroideos, células endoteliales y en la luz de los vasos, meninges, células de Purkinje y sustancia blanca, la cual estuvo ausente en las madres del grupo control. Este hallazgo que se observó en las transducciones a los 12 y 15 d.pc. es muy notable, pues a la fecha no se ha reportado transducción intracerebral por ninguna ruta de administración con excepción de la transducción intraencefálica directo.

VII.VI. Estudios de transducción y toxicidad.

El proceso de transducción intra-amniótica mediante laparotomía exploratoria fue desarrollado para el tratamiento *in utero* por terapia génica de productos con enfermedades hereditarias (*Holzinger y cols, 1995*). Este proceso descrito previamente ha demostrado transducciones exitosas con mínimas alteraciones del desarrollo embrionario (*Lipshutz y cols, 1999*).

Dentro de este estudio se consideraron varios factores, algunos de los cuales fueron notados durante el avance de la tesis. Por ejemplo, cuando el proceso era llevado a cabo por más de 1 h, se observaron grados severos de desecación y pérdida de calor del cuerno y órganos adyacentes. La recuperación postquirúrgica estuvo relacionada con la duración del proceso quirúrgico, en la cual probablemente los animales se expusieron a periodos prolongados de hipotermia y deshidratación. Después de algunos ensayos logramos establecer que el procedimiento se realizara en aproximadamente media hora, durante la cual los tejidos se irrigaban de manera continua con solución fisiológica estéril. La aguja utilizada se retiró lentamente para evitar cualquier fuga de líquido amniótico, evitando de esta manera cambios en la

presión osmótica del espacio intra-amniótico. La inyección fue realizada a un flujo promedio de 1 μ l/5 s.

Las transducciones realizadas abarcaron desde siete embriones transducidos hasta un mínimo de un embrión. Finalmente se obtuvo una supervivencia del 100% en aquellas ratas donde se realizaron menos de cuatro transducciones; dos embriones transducidos y dos controles en el mejor de los casos, variando a dos embriones transducidos y un control. Estos resultados también fueron obtenidos por *Schachtner y cols.* en 1999. Debido a que nunca se obtuvieron más de cuatro transducciones por rata, los fetos que fueron procesados posteriormente constituyen un porcentaje muy bajo del estudio. Las muertes y malformaciones a los 12 d.p.c. fueron debidas al proceso de transducción y no a la carga viral, pues estos mismos resultados fueron observados en los controles del estudio. En este estudio a diferencia de lo encontrado por *Holzinger y cols.* 1995, no existió ningún parto prematuro, cuyo resultado estaría ligado de manera directa al proceso quirúrgico desarrollado. Ninguna hembra presentó un parto prematuro debido al vector o a la cirugía y en todos los casos, el sacrificio se realizó antes del parto.

A pesar de los resultados obtenidos por otros autores, los cuales reportan malformaciones en fetos a dosis de partículas totales virales de 1×10^9 - 1×10^{10} (*Jerebtsova y cols.* 2000), en las dosis utilizadas para este estudio no se reportan malformaciones incluso a concentraciones altas como 1×10^{11} partículas virales totales. Estos resultados son obtenidos principalmente a los 15 d.p.c. Aunque a los 12 d.p.c. no se obtienen fetos malformados, este hallazgo requiere confirmación, pues el número de fetos analizados fue muy bajo. Es importante anotar la ocurrencia de una muerte fetal que pudo haber sido ocasionada por la carga viral o por el proceso de transducción en sí.

La expresión obtenida en los órganos maternos y los tejidos fetales fue mayor en las transducciones realizadas en el estadio más tardío analizado en

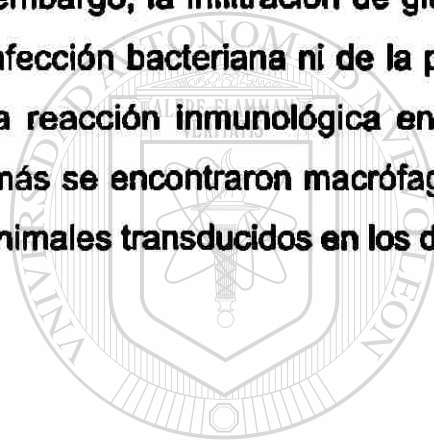
este estudio. La expresión en intestino delgado, piel y vías aéreas altas en el feto son muy abundantes. En las madres transducidas a los 15 d.p.c., los riñones, el bazo, y cerebro presentan una transducción muy considerable si se compara con aquella obtenida a los 12 d.p.c.

Los resultados obtenidos para ambas rutas de transducción, tanto intra-amniótica como intravenosa, muestran en común una intensa transducción del intestino, la cual se diferencia en que las células de las capas apicales están más transducidas en la primera, mientras que las basales están más transducidas en la segunda. La transducción de las vías digestivas fetales por ambas rutas de administración no se asocia a enterocolitis o procesos necróticos en las mismas. Este hallazgo puede ser utilizado en la terapia génica dirigida a anomalías de sistema digestivo.

Nuevamente, resulta muy notable la transducción intracerebral, la cual ya se había notado en la ruta intravenosa. Sin embargo, en esta ruta la transducción es más intensa, abarca más estructuras (neuronas) y se presenta en una proporción mayor de madres tratadas (100%).

Definitivamente, la transducción del sistema nervioso central es uno de los hallazgos más notables de esta tesis y requiere ser estudiada con nuevos experimentos enfocados a confirmar el hallazgo, el cual podría ser particular de esta especie. También es muy importante notar la transducción de los tejidos germinales y muy particularmente, la transducción de un óvulo en ratas tratadas en el 12 d.p.c. Aunque es muy posible que este fenómeno sea debido a la diseminación del vector en la cavidad esplácnica después de la administración, la importancia del hallazgo radica en que, se transdujo la línea germinal y esto tendría implicaciones serias en los protocolos de terapia génica humana, pues este evento es totalmente indeseable (Ye y cols., 1998).

Se ha reportado que la transferencia génica con vectores adenovirales está asociada a respuestas inmunes tanto humorales como celulares y toxicidad en órganos particulares, como el hígado. (Zepeda y cols., 1996). A diferencia de otros estudios donde los órganos son analizados 72 h después de la transducción (Wood y cols., 1999), en este trabajo no existió una respuesta inmune representativa, a pesar de que los órganos en este estudio fueron recolectados 8 días y 5 días después de la transducción en cada estadio gestacional. En este estudio se observaron infiltrados de células inflamatorias (linfocitos) en glándula suprarrenal y placenta en las transducciones realizadas a los 15 d.p.c. Los infiltrados placentarios son debidos a la presencia de bacteria. Sin embargo, la infiltración de glándulas suprarrenales no estuvo acompañada de infección bacteriana ni de la presencia del vector y desconocemos la razón de la reacción inmunológica en este órgano. Es importante mencionar que además se encontraron macrófagos intra-alveolares en los pulmones maternos en animales transducidos en los dos puntos de edad gestacional analizados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VIII. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos se pueden concluir las siguientes conclusiones:

El grado de manipulación ejercido durante la toma de citologías vaginales se relacionó directamente con el éxito en el diagnóstico y veracidad del estado de embarazo. La forma más certera y rápida de identificar un estado de embarazo, estuvo determinada por la toma de muestra vaginal a la mañana siguiente, posterior a un apareamiento durante toda una noche con machos fértiles. Aunque se puede realizar un muestreo para la determinación de la fase del ciclo estral en que se encuentra cada animal, éste procedimiento sólo representa un esfuerzo adicional que puede ser remplazado por el muestreo vaginal en la mañana siguiente al apareamiento.

Los resultados en este trabajo a estadios tempranos de embriogénesis, sugieren que la manipulación ejercida en cavidad amniótica puede ser realizados con agujas de grosor mínimo y con sistemas de microscopía estereoscópica que permitan observar a través de la cavidad amniótica. El grosor de la aguja utilizada para este estudio está directamente relacionado con, la cantidad de líquido amniótico que escapa de la cavidad, la supervivencia del producto y el grado de deformaciones intrauterinas. Se determinó que no se pueden administrar volúmenes mayores a 10 μ l en cavidad amniótica y que estas deben administrarse en rangos de 1 μ l/s- 3 μ l/s. El esperar por lo menos 5 s con la aguja dentro de la cavidad amniótica, una vez inyectada la carga viral, incrementa la supervivencia del producto.

La labilidad excesiva tanto de la madre como del feto en procesos quirúrgicos (laparotomía exploratoria), así como la manipulación en cavidad amniótica en estadios tempranos de embriogénesis activa (9 d.p.c.), interrumpió

el progreso del embarazo y no se logró ninguna transducción exitosa con la sobrevivencia de la madre y el producto, aún con las variaciones en las técnicas utilizadas y en el número de transducciones en una misma rata.

Los altos porcentajes de muerte fetal observados a los 12 d.p.c. puede atribuirse a la excesiva manipulación durante el proceso quirúrgico y a la labilidad y sensibilidad del feto a los procesos manipulativos. Esto también puede ser debido a la susceptibilidad del producto a agentes biológicos, como los vectores virales. Estudios más extensos y detallados deben ser conducidos para corroborar estas hipótesis.

El intestino delgado fetal es el órgano transducido por excelencia en los dos estadios gestacionales estudiados (12 y 15 d.p.c.) y en las dos rutas de administración utilizadas. Esta transducción se evidencia en todos los estratos celulares analizados. Aunque existen diferencias de transducción entre las vías analizadas en este estudio, puede sugerirse al intestino delgado como un tejido blanco propicio para protocolos de terapia génica. Pudieran ser considerados protocolos de terapia génica para otros tejidos fetales como piel y vías aéreas superiores, aunque quizás los niveles de transducción no sean tan satisfactorios comparados con los niveles obtenidos para el intestino delgado. Así también deben ser considerados los estadios a los cuales se realizará la transducción, debido a la específica avidéz del vector por los tejidos blanco.

La gran sorpresa fue la presencia del vector adenoviral en plexos coronarios meninges y neuronas de la madre, tanto para la transducción i.v. como i.a. en cualquier estadio gestacional estudiado. Se requieren estudios adicionales para confirmar esta observación, la cual tendría repercusiones preclínicas importantes para posteriores estudios de toxicidad materna.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Anderson I, Morse LM.** The Influence of Solvent on the Teratogenic Effect of Folic Acid Antagonist in the Rat. *Exp Mol Pathol.* 1966; 5:134-145.
2. **Baldwin HS, Mickanin C, Buck C.** Adenovirus-mediated Gene Transfer During Initial Organogenesis in the Mammalian Embryo is Promoter-Dependent and Tissue-Specific. *Gen Ther.* 1997; 4:1142-1149.
3. **Ballard PL, Zepeda MAL, Schwartz M, Polez N, Wilson JM.** Adenovirus-Mediated Gene Transfer to Human Fetal Lung Ex vivo. *Am J Physiol.* 1995; 268:839-845.
4. **Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH.** The Laboratory Rat Volume II. Research Applications. Academic Press. San Diego, CA. 1980.
5. **Beltz GA, Flint SJ.** Inhibition of HeLa Cell Protein Synthesis During Adenovirus Infection. *J Mol Biol.* 1979; 131:353-373.
6. **Berget SM, Moore C, Sharp PA.** Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74:3171-3175.
7. **Berk AJ, Sharp PA.** Sizing and Mapping of Early Adenovirus mRNAs by Gel Electrophoresis of S1 Endonuclease Digested Hybrids. *Cell.* 1977;12:721-732.
8. **Bragg H** Disturbances in Mammalian Development Produced by Radium Emanation. 1922.
9. **Cooney AH, Burns JJ.** Metabolic Interactions Among Environmental Chemicals and Drugs. *Science.* 1972; 178:576-586.
10. **Challberg MD, Kelly TJ.** Adenovirus DNA Replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76:655-659.
11. **Cheng DY, Kolls JK, Lei D, Noel RA.** In vivo and in vitro Gene Transfer and Expression in Rat Intestinal Epithelial Cells by E1-deleted Adenoviral Vector. *Hum Gene Ther.* 1997; 8:755-764.

12. **Chow LT, Broker TR.** The Elucidation of RNA Splicing in the Adenoviral System. En: Johnson LE, Kimball PC, Perlman PS. Eds Gene structure and expression. Columbus. Ohio: Ohio State University Press. 1980. p. 175-209.
13. **DeMyer W, Baird I.** Mortality and Skeletal Malformations from Amniocentesis and Oligohydramnios in Rats: Cleft Palate, Clubfoot, Microstomia, and Adactyly. *Teratol.* 1969; 2:33-37.
14. **Douar AM, Adebakin S, Themis M, Pavirani A, Cook T, Coutelle C.** Fetal Gene Delivery in Mice by Intra-amniotic Administration of Retroviral Producer Cells and Adenovirus. *Gene Ther.* 1997; 4:883-890.
15. **Edwards JF, Karabatsos N, Collisson EW, de la Concha BA.** Ovine Fetal Malformations in Viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56:171-176.
16. **Enders JF, Bell JA, Dingle JH.** Adenoviruses: Group Name Proposed for New Respiratory-Tract Viruses. *Science.* 1956; 124:119-120.
17. **Fenner F, McAuslan B, Mims C, Sambrook J, White D.** The Biology of Animal Viruses. Academic Press Inc. San Diego, CA. 1974.
18. **Fisher DL, Smithberg M.** Early and Late Effects of *in vitro* Exposure of Preimplantation Mouse Embryos to Trypan Blue. *Teratol.* 1972; 6:159-166.
19. **Gaensler K, Flebbe-Rehwaldt L y Lipshutz G.** Re-expression Following Readministration of an Adenoviral Vector in Adult Mice after Initial In Utero Adenoviral Administration. *Mol Ther.* 2000; 1:5 (S300).
20. **Graham FL, Prevec L.** Methods for Construction of Adenovirus Vectors. *Mol Biotech.* 1995; 3: 207-220.
21. **Graham FL, Prevec L.** Manipulation of Adenoviral Vectors. In *Gene Transfer and Expression Protocols. Vol 7.* (E. J. Murray, Ed.). Humana Press, Clifton, NJ. 1991. p. 109-127.
22. **Green M, Piña M, Kimes R, Wensink PC, MacHattie LA, Thomas CA.** Adenovirus DNA I. Molecular Weight and Conformation. *Proc Natl Acad Sci.* 1967; 57:1302-1309.

23. Harting PC, Hunter JC. Gene Delivery to the Neurological Embryo During Culture. *Teratol.* 1998; 58:103-112.
24. Hayashi SI, Morishita R, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, Nakajima M, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo Transfer of Gene and Oligodeoxynucleotides into Skin of Fetal Rats by Incubation in Amniotic Fluid. *Gene Ther.* 1996;3: 878-885.
25. Hogan MJ, Crawford JW. Epidemic Keratoconjunctivitis (Superficial Puncture keratitis, Keratitis subepithelialis, Keratitis maculosa, Keratitis nummularis). *Am J Ophthalmol.* 1942; 25:1059-1078.
26. Holzinger A, Trapnell BC, Weaver TE, Whitsett JA, Iwamoto HS. Intraamniotic Administration of an Adenoviral Vector for Gene Transfer to Fetal Sheep and Mouse Tissues. *Ped Res.* 1995; 38:6.
27. Horne RW, Bonner S, Waterson AP, Wildy P. The Icosahedral Form of an Adenovirus. *J Mol Biol.* 1959; 1:84-86.
28. Iwamoto HS, Trapnell BC, McConnel CJ, Daugherty C, Whitsett JA. Pulmonary Inflammation Associated with Repeated, Prenatal Exposure to an E1, E3-Deleted Adenoviral Vector in Sheep. *Gene Ther.* 1999; 6:98-106.
29. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y. Adenovirus-Mediated *in vivo* Gene Transfer and Expression in Normal Rat Liver. *Nat Gen.* 1992; 1:372-378.
30. Jawetz E. The story of shipyard eye. *Br Med J.* 1959; 1:873-878.
31. Jerebtsova M, Mitchell M, Batshaw M, Newman K and Xuehai Y. Efficient Gene Transfer to Mouse Fetuses with Recombinant Adenoviral and Adeno-associated Virus (AAV) Vectors. *Mol Ther.* 2000; 1:5 (S301).
32. Jordan EK, Sever JL. Fetal Damage Caused by Parvoviral Infections. *Reprod Toxicol.* 1994; 8:161-189.
33. King CTG, Horgan E, Wilk AL. Fetal Outcome from Prolongated Versus Acute Drug Administration in the Pregnant Rat. En: *Drugs and Fetal Development.* Klingberg MA, Abramovici AA, Chemke J (eds). Plenum Press, New York, NY. 1972. p. 61-75.

34. Kubisch HM, Larson MA, Eichen PA, Wilson JM, Roberts RM. Adenovirus-Mediated Gene Transfer by Perivitelline Microinjection of Mouse, Rat and Cow Embryos. *Biol Reprod.* 1997; 56:119-124.
35. Larson JE, Morrow SL, Delcarpio JB, Bohm RP, Katterree MS, Blanchard JL, Cohen JC. Gene Transfer into the Fetal Primate: Evidence for the Secretion of Transgene. *Prod Mol Ther.* 2000; 2:631-639.
36. Latchman DS. From Genetics to Gene Therapy: The Molecular Pathology of Human Disease. BIOS Scientific Publishers. 1994, p.554-570.
37. Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A, Levine F. Gene Transfer to Human Pancreatic Endocrine Cells Using Viral Vectors. *Diabetes.* 1999; 48:745-753.
38. Liebert MA. Prenatal Gene Transfer: Scientific, Medical, and Ethical Issues. *Hum Gen Ther.* 2000; 11:1211-1229.
39. Lipshutz GS, Flebbe-Rehwaldt L, Gaensler KM. Adenovirus-mediated Gene Transfer to the Peritoneum and Hepatic Parenchyma of Fetal Mice In Utero. *Surgery.* 1999; 126:171-177.
40. Lipshutz GS, Flebbe-Rehwaldt L, Gaensler KM. Adenovirus-mediated Gene Transfer in the Midgestation Fetal Mouse. *J Surg Res.* 1999; 84:150-156.
41. Lipshutz GS, Flebbe-Rehwaldt L, Gaensler KM. Reexpression Following Readministration of an Adenoviral Vector in Adult Mice after Initial in Utero Adenoviral Administration. *Mol Ther.* 2000; 2:374-380.
42. MacCalman CD, Furth EE, Omigbodun A, Kozarsky KF, Coutifaris C, Strauss JK. Transduction of human trophoblast cells by recombinant adenoviruses is differentiation dependent. *Biol Reprod.* 1996; 54:682-691.
43. McCray PB, Armstrong K, Zabner J, Miller DW, Koretzky GA, Couture L, Robillard JE, Smith AE, Wels MJ. Adenoviral-Mediated Gene Transfer to Fetal Pulmonary Epithelia *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest.* 1995; 95:2620-2632.
44. Masato S, Matsubara Y, Fujii K, Nagasaki Y, Hiratsuka M, Kure S, Uehara S, Okamura K, Yamija A, Narisawa N. Adenovirus-Mediated in Utero

- Gene Transfer in Mice and Guinea Pigs: Tissue Distribution of Recombinant Adenovirus Determined by Quantitative TaqMan-Polymerase Chain Reaction Assay. *Mol Gen Met.* 2000; 69:269-276.
45. Montone KT, Furth EE, Pietra GG, Gupta PK. Neonatal Adenovirus Infection: a Case Report with *in situ* Hybridization Confirmation of Ascending Intrauterine Infection. *Diagn Cytopathol.* 1995; 12:341-344.
46. Moya F, Thonrdike V. Passage of drugs across the Placenta. *Am J Obst Gynecol.* 1962; 84:1778-1798.
47. Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. *Microbiología Médica.* Edit. Mosby. Madrid, España. 1996.p.125-126.
48. Neighbour PA. Studies on the susceptibility of the mouse preimplantation embryo to infection with cytomegalovirus. *J Reprod Fertil.* 1978; 54:15-20.
49. Neve RL. Adenovirus enters the brain. *Trends Neurosci.* 1993; 16:251-253.
50. Hiroaki O, Setsuro I, Donald HD, Masatoshi F. Adenovirus-Mediated Gene Transfer to Cerebral Circulation. *Mech Age and Dev.* 2000; 116:95-101.
51. Parry S, Holder J, Halterman MW, Weitzman MD, Davis AR, Federoff H, Strauss JF. Transduction of human trophoblastic cells by replication-deficient recombinant viral vectors. Promoting cellular differentiation affects virus entry. *Am J Pathol.* 1998; 152:1521-1529.
52. Parsonson IM; Della-Porta AJ, Snowdon WA. Congenital abnormalities in newborn lambs after infections of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect Immun.* 1977; 15:254-262
53. Pitt BR, Schwarz MA, Pilewski JM, Nakayama D, Mueller GM, Robbins PD, Watkins SA, Albertine KH, Balnd RD. Retrovirus-mediated Gene Transfer in Lungs of Living Fetal Sheep. *Gene Ther.* 1995; 2:344-350.
54. Ranucci-Weiss D, Uerpairojkit B, Bowles N, Towbin JA, Chan L. Intrauterine adenoviral infection associated with fetal non-immune hydrops. *Prenat Diagn.* 1998; 18:182-185.

55. Rojas-Martínez A, Wyde PR, Montgomery CA, Chen SH, Woo SCL, Aguilar-Córdova E. Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1A-recombinant adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat. *Cancer Gene Ther.* 1998; 5:365-370.
56. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 84:570-573.
57. Schachtner SK, Buck CA, Bergelson JM, Baldwin HS. Temporally Regulated Expression Patterns Following in Utero Adenovirus-Mediated Gene Transfer. *Gene Ther.* 1999; 6:1249-1257.
58. Schardein JL. "Drugs and Teratogens" CRC Press, Cleveland, Ohio. 1976
59. Senut MC, Suhr ST, Gage FH. Gene Transfer to the Rodent Placenta In Situ. *J Clin Invest.* 1998; 101:1565-1571.
60. Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, Wilson JM. Adenovirus-mediated Transfer of the CFTR Gene to Lung of Nonhuman Primates: toxicity study. *Hum Gen Ther.* 1993; 4:771-780.
61. Strayer MS, Guttentag SH, Ballard PL. Targeting type II and Clara Cells for Adenovirus-Mediated Gene Transfer Using the Surfactant Protein B Promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 18:1-11.
62. Tarantal AF, O'Rourke JP, Case SS, Newbound GC, Li J, Lee CI, Baskin CR, Kohn DB, Bunnell BA. Rhesus monkey model for fetal gene transfer: studies with retroviral-based vector systems. *Mol Ther.* 2001; 3:128-38.
63. Themis M, Schneider H, Kiserud T, Cook T, Adebakin S, Jezzard S, Forbes S, Hanson M, Pavirani A, Rodeck C and Coutelle C. Successful Expression of β -galactosidase and Factor IX Transgenes in Fetal and Neonatal Sheep After Ultrasound-guided Percutaneous Adenovirus Vector Administration into the Umbilical Vein. *Gene Ther.* 1999; 6:1239-1248.
64. Thompson L. Human Gene Therapy, Harsh Lessons, High Hopes. *FDA Consumer.* September-October. 2000; 19-24.

65. **Trasler DG.** Influence of Uterine Site on Occurrence of Spontaneous Cleft Lip in Mice. *Science*. 1960; 132:420-421.
66. **Tretin JJ, Yabe Y, Taylor G.** The quest for human cancer viruses. *Science*. 1962; 137:835-849.
67. **Turkay A, Saunders T, Kurachi K.** Intrauterine gene transfer: gestational stage-specific gene delivery in mice. *Gene Ther*. 1999; 6:1685-1694.
68. **Tohru T, Sanae M, Sadahiro A, Hirotake I, Izumu S, Yutaka T.** Gene Transfer and Expression in Mouse preimplantation Embryos by Recombinant Adenovirus Vector. *Mol Rep Dev*. 1995; 42:291-297.
69. **Vincent MC, Trapnell BC, Baughman RP, Wert SE, Whitsett JA, Iwamoto HS.** Adenovirus-Mediated Gene Transfer to the Respiratory Tract of Fetal Sheep In Utero. *Hum Gene Ther*. 1995; 6:1019-1028.
70. **Vincent N, Ragot T, Gilgenkrantz H, Couton D, Chafey P, Gregoire A, Briand P, Kaplan J-C, Kahn A, Perricaudet M.** Long Term Correction of Mouse Dystrophic Degeneration by Adenovirus-Mediated Transfer of a Minidystrophin Gene. *Nat Genet*. 1993; 5: 130-134.
71. **Wang G, Williamson R, Muller G, Thomas P, Davidson BL, McCray PB.** Ultrasound-guided Gene Transfer to Hepatocytes In Utero. *Fetal Diagn Ther*. 1998; 13:197-205.
72. **Wigand R, Baumeister HG, Maass G, Kuhn J, Hammer HJ.** Isolation and identification of enteric adenoviruses. *J Med Virol*. 1983; 11:233-240.
73. **Wilkinson GWG, Akrigg A.** Constitutive and enhanced expression from a defective adenovirus vector. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20:2233-2239.
74. **Wilson JG.** Environment and Birth Defects. Academic Press, New York, NY. 1973.
75. **Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR.** Biodistribution of an Adenoviral Vector Carrying the Luciferase Reporter Gene Following Intravesical or Intravenous Administration to a Mouse. *Cancer Gen Ther*. 1999; 6:367-372.

76. Xing A, Boileau P, Caüzac M, Challier JC, Girard J, Hauguel-De MS. Comparative in Vivo Approaches for Selective Adenovirus-Mediated Gene Delivery to the Placenta. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 167-177.
77. Yang EY, Gass DL, Sylvester KG, Wilson JM, Adzick NS. Fetal Gene Therapy: Efficacy, Toxicity, and Immunologic Effects of Early Gestation Recombinant Adenovirus. *British Association of Pediatric Surgeons. J Pediatr Surg.* 1999; 34:235-241.
78. Yang EY, Kim HB, Shaaban AF, Milner R, Adzick NS, Flake AW. Persistent Postnatal Transgene Expression in Both Muscle and Liver After Fetal Injection of Recombinant Adenovirus. *J Pediatr Surg.* 1999; 34:766-772.
79. Ye X, Gao GP, Pabin C, Raper SE, Wilson JM. Evaluating the Potential of Germ Line Transmission After Intravenous Administration of Recombinant Adenovirus in the C3H Mouse. *Hum Gene Ther.* 1998; 9:2135-2142.
80. Zepeda M, Wilson JM. Neonatal Cotton Rats do not Exhibit Destructive Immune Responses to Adenoviral Vectors. *Gen Ther.* 1996; 3:973-979.

APÉNDICE A. Embriogenesis de la rata

Cara y formas externas del cuerpo.

Día de gestación	Eventos relevantes en la organogénesis
9-10	Somitas 1-4 son identificables. El embrión presenta una curvatura ventral y aparecen los primeros arcos branquiales.
10-11	Los somitas 5-20 aparecen en la región cervical; el segundo arco branquial aparece; la curvatura reversa del cuerpo tiene lugar; la superficie dorsal del embrión se vuelve convexa. La cola se pliega y la pared lateral del cuerpo toma forma plegada, los procesos maxilares aparecen.
11-12	Aparecen los somitas 21-33 en las regiones torácicas y lumbares, los brotes de los miembros anteriores aparecen seguidos por la aparición un día y medio después de las extremidades posteriores. Los arcos branquiales 3ro y 4to aparecen, los procesos nasales laterales y mediales son reconocibles, los hoyos olfatorios son formados, el sinus cervical empieza su desarrollo.
12-13	Los somitas 34-45 se forman en la región caudal. Los procesos mandibulares, maxilares y fontonasaes son prominentes. Los procesos maxilares han crecido por detrás de las vesículas ópticas para encontrarse con los procesos nasales laterales. Las muescas nasolagrimales se forman, los procesos nasales mediales y laterales entran en contacto y empiezan a fundirse los hoyos ventrales con los nasales. Los arcos mandibulares empiezan a emerger para formar la mandíbula inferior, el sinus cervical se empieza a cerrar, los oteros auriculares aparecen sobre los arcos mandibulares.
13-14	Se desarrollan los somitas 46-51. El sinus cervical se cierra. Los conductos auditivos externos se desarrollan provenientes de la primera hendidura visceral. La boca es estrecha, los oteros auriculares aparece sobre los arcos hioideos, las yemas de las extremidades anteriores entran al estado de remo o paleta seguidos en brevedad por las yemas de las extremidades posteriores. La herniación umbilical normal empieza, aparece el párpado superior, los procesos maxilares se fusionan con los procesos nasales mediales para formar el labio superior.
14-15	Están presentes los somitas 52-60, pero su identificación se vuelve difícil. La papila vibrissary aparece sobre los procesos maxilares, las condensaciones digitales empiezan en las extremidades de las yemas en el día de las extremidades traseras. Los párpados inferiores se forman. Los arcos loideos y mandibulares emergen por debajo del canal auditivo externo. Las orejas empiezan a formarse, las nares externas están totalmente diferenciadas. El cuerpo se desenrolla de su forma en C. Los primeros cartilagos esqueléticos aparecen en las costillas. El primer centro de osificación aparece en la mandíbula.

Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en embriones de rata

15-16	Están presentes los somitas 61-65, parecen las papilas para el pelo en el tronco, la mayoría de los huesos en el cuerpo son identificables.
16-17	Los dígitos están completamente separados en las plantillas anteriores.
17-18	La hernia umbilical empieza a retirarse, el pinnax cubre los conductos auditivos, los dígitos están completamente separados en las plantillas posteriores.
18-19	Los párpados se fusionan, la hernia umbilical se retira completamente.

Sistema nervioso.

Día de gestación	Eventos relevantes en la organogénesis.
8-9	Aparece la placa neural.
9-10	Se forman los pliegues neurales y se comienzan a fusionar en la región de los somitas 2-6. La cresta neural es formada en la conjunción de los pliegues neurales y la superficie del ectodermo. Evaginaciones ópticas aparecen en el prosencéfalo.
10-11	Está presente el cerebro de tres vesículas, el prosencéfalo, mesencéfalo y el rombencéfalo, aparece el infundíbulo como una depresión en el piso del prosencéfalo, aparecen las placodes óticas y se empiezan a hundir debajo de la superficie. El ganglio cerebral inicia su formación, las vesículas óticas contactan la superficie del ectodermo. El tubo neural es cerrado excepto en los neuroporos anterior y posterior. La tabaquera de Rathke empieza su crecimiento del techo de la futura boca.
11-12	El cerebro de cinco vesículas está presente, el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y el mielencéfalo. El neuroporo anterior se cierra seguido de manera cercana por el posterior. Las copas óticas empiezan a formar dos capas. Las lentes placodes se forman., las vesículas óticas se cierran y el conducto endolinfático aparece, las placodes olfatorias aparecen y empieza su transformación en agujeros olfatorios. El pouch de Rathke hace contacto con el infundíbulo, formando el primordio de la hipófisis; en el diencefalo el hipotálamo es diferente del área talámica dorsal.
12-13	Los hemisferios cerebrales están presentes, la fisura coroidea es identificable, la porción auditiva del oído interno está en desarrollo, y el primordio del utrículo, el sáculo y la coclea son reconocibles, los conductos endolinfáticos se separan de las vesículas óticas.
13-14	Los primordios de los canales semicirculares se están formando. El primordio del cerebelo está presente como una placa gruesa en el metencéfalo, los plexos coroideos aparecen en el primero, segundo y cuarto ventrículos, las vesículas de los lentes completan su formación y comienza su separación de la epidermis.
15-16	El plexo coroideo aparece en el tercer ventrículo.
16-17	La fisura coroidea está cerrada completamente.
19-20	En el mesencéfalo, el cuerpo cuadrigémino es reconocible.

Sistema circulatorio.

Día de gestación	Eventos relevantes en la organogénesis.
8-9	El primordio cardiogénico aparece en el mesodermo enfrente de la placa oral.
9-10	Empieza la fusión bilateral del primordio cardiogénico de manera ventral hacia el intestino anterior; el arco aórtico está en formación; el corazón tubular simple se forma y empiezan las contracciones esporádicas.
10-11	Un corazón de forma en S está presente, los arcos aórticos II y III aparecen; las venas cardinales, umbilicales y vitelinas pueden ser reconocidas; el atrio, el ventrículo y el sinus venoso pueden ser identificados, la circulación embrionaria es establecida.
11-12	Los arcos aórticos III y IV están bien desarrollados, los arcos I y II están en regresión; el septum interventricular inicia su formación, el septum primum aparece en el atrio.
12-13	El arco aórtico IV se desarrolla; la unión atrioventricular ventral y dorsal se forma; la punta del septo truncoconal aparece e inicia su fusión.
13-14	El septum primum se completa y se forma el foramen secundum; la unión atrioventricular está fusionándose.
14-15	La Aorta es separada de la arteria pulmonar, el canal atrioventricular es dividido.
15-16	Los arcos aórticos son transformados a su configuración adulta, el corazón se encuentra totalmente dividido, excepto por el foramen ovale.

Sistema urogenital.

Día de gestación	Eventos relevantes en la organogénesis.
8-9	Se forma el mesodermo intermedio, que es el precursor del sistema urogenital.
9-10.	Las células germinales son identificables en el epitelio del saco vitelino.
10-11	Las puntas nefrogénicas aparecen como condensaciones en el mesodermo intermedio, los conductos pronéfricos empiezan su formación en el lado dorsal de las puntas nefrogénicas, las células germinales empiezan a migrar del saco vitelino, entrando al intestino distal y mesenterio.
11-12	Se desarrollan los primeros túbulos mesonéfricos, los conductos mesonefricos alcanzan la cloaca, pero la luz no está abierta en su longitud total, las puntas gonadales parecen mediales con respecto a las puntas mesonéfricas, las primeras células germinales entran a las puntas gonadales.
12-13	La luz de los conductos mesonéfricos se vuelven confluentes con el lumen de la cloaca, el divertículo ureteral aparece y cada uno se rodea de una capa de mesénquima, el sistema metanéfrico; el mesonefros alcanza su mayor desarrollo y empieza a degenerar;

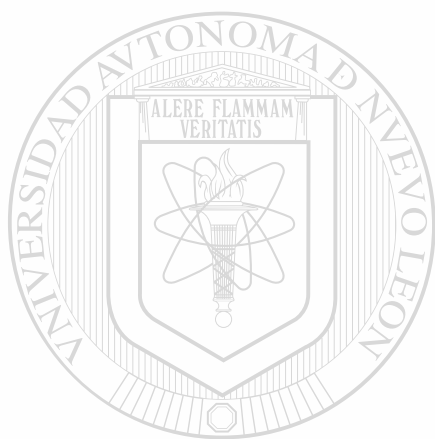
Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en embriones de rata

	las células germinales terminan su migración hacia la gónada indiferenciada; el pliegue urorectal empieza la partición de la cloaca.
13-14	Las gónadas empiezan su diferenciación sexual, los conductos paramesonéfricos empiezan a formarse como invaginaciones del epitelio celómico; el tubérculo genital se forma.
14-15	Las gónadas son identificables como ovarios o como testículos; los riñones empiezan su ascenso.
15-16	Los conductos paramesonéfricos alcanzan el sinus urogenital, los testículos empiezan su descenso, la cloaca está dividida en sinus urogenital y en el recto.
17-18	El glomérulo renal y los túbulos son reconocibles, la acumulación de líquido empieza en el riñón, las pelvillas y los cálices renales están dilatados, los riñones están en su posición final, los conductos paramesonéfricos se unen para formar el canal útero-vaginal.
18-19	Todo el mesonefros degenera, excepto por las porciones apropiadas por la gónada masculina.
19-20	Los testículos descansan de manera lateral a la vejiga y cercanos a la pared de la pelvis, el conjunto heterólogo de conductos genitales ha desaparecido en su mayoría, las vesículas seminales aparecen sobre las paredes laterales de los conductos deferentes; las yemas prostáticas crecen fuera de la uretra.

Sistema digestivo.

Día de gestación	Eventos relevantes en la organogénesis.
9-10	El intestino empieza a formarse.
10-11	La membrana oral se rompe; el septum transversum está en posición ventral con respecto al Intestino anterior; se forma el divertículo hepático; la primera bolsa faríngea está presente; el primordio tiroideo aparece como una tumba en el piso de la faringe, el intestino terminal empieza su formación.
11-12	La ranura laringotraqueal aparece, el primordio del páncreas dorsal está presente, es reconocible el estómago; la segunda y tercera bolsa faríngea son identificables, las yemas de los pulmones se forman, los cordones del hígado empiezan a formarse.
12-13	El pliegue pleuroperitoneal aparece, la cuarta y sexta bolsa faríngea se forma; la yema pancreática ventral se forma; el primordio del paratiroides, el timo y el último cuerpo branquial están presentes, la división de la cloaca inicia.
13-14	La herniación umbilical inicia; el primordio pancreático dorsal y ventral se fusionan; los procesos palatinos aparecen en los procesos maxilares; el paladar primario primitivo se forma sobre el proceso frontonasal y se empieza a fusionar con las placas palatinas; las naras posteriores se vuelven visibles; el piso de la boca es formado por un proceso mandibular emergente, el primordio de la lengua aparece.

14-15	Las ranuras labiodentales aparecen, el hígado adquiere su configuración adulta, y los tejidos de islotes pancreáticos se desarrollan.
15-16	La cloaca se divide en el sinus urogenital y en el recto., se completa el diafragma con el cierre de los canales pleuroperitoneales, la membrana anal se rompe.
16-17	Las papilas aparecen sobre el dorso de la lengua, las placas del paladar son elevadas y la fusión se inicia.
17-18	La hernia umbilical es removida, la fusión del paladar es completada.
18-19	La hernia umbilical desaparece.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE B. Ciclo estral de la rata

- **Diestro.** En el campo microscópico aparecen abundantes leucocitos y muy escasas células epiteliales de la capa basal.
- **Proestro.** Esta fase coincide con un gran aumento del tamaño del ovario, debido a la presencia de abundantes folículos. Además en la vagina se aumenta un progresivo engrosamiento epitelial. En el frotis se presentan escasos leucocitos (-10%) abundantes células epiteliales de núcleo redondeado y voluminoso con citoplasma basófilo (+60%), y algunas pero muy escasas células cornificadas de los estratos superiores (-30%). En la rata esta fase dura aproximadamente unas 12 hrs.
- **Estro.** Coincide esta fase con el máximo aumento de actividad estrogénica. Microscópicamente se observan escasos leucocitos (-10%), muy pocas células epiteliales (-25%) y un gran aumento de células cornificadas, con núcleos picnóticos y citoplasma eosinófilo. En esta fase pueden observarse imágenes en forma de "hojas de helecho", típicas de la cristalización del moco vaginal.
- **Metaestro.** En esta fase se inicia la regresión del epitelio vaginal, coincidiendo con la presencia de cuerpos lúteos en el ovario. Paulatinamente van desapareciendo las células cornificadas y aumentando los leucocitos y las células epiteliales de capas basales – núcleo redondeado y menor basofilia que en la fase de proestro. Esquemáticamente, se puede decir que las células más superficiales (cornificadas) son de gran tamaño, su citoplasma es eosinófilo y su núcleo picnótico, mientras que las células más basales son de menor tamaño, su citoplasma es basófilo y su núcleo redondeado, bastante voluminoso.

APÉNDICE C. Control del medio ambiente para el modelo experimental

- **TEMPERATURA.** Las instalaciones de animales del laboratorio ya sean para reproducción o experimentación, deben mantener una temperatura estable dentro de los cuartos, misma que oscilará de los 16-26°C. (Referencia, temperatura tomada con termómetro de bulbo seco).
- **HUMEDAD RELATIVA.** Las instalaciones que alojan animales de laboratorio, deben proveer una humedad relativa entre el 40 y 70%.
- **VENTILACIÓN.** Las instalaciones para animales de laboratorio deben poseer un sistema de ventilación eficaz, que permita un recambio de aire ambiental que cubra un rango mínimo de 15 a 18 recambios de aire total por hora. El sistema debe funcionar ininterrumpidamente las 24 horas del día, a fin de favorecer una definición ambiental aceptable que no afecte negativamente la salud animal y la respuesta experimental.
- **ILUMINACIÓN.** Las instalaciones del bioterio estarán iluminadas mediante luz artificial tipo luz de día usando lámparas fluorescentes. El control de los ciclos de luz se afectuará por medio del uso de relojes interruptores automáticos, ajustados de acuerdo con las necesidades de los animales en cuestión. La intensidad lumínica no debe exceder de 1,345 lúmenes para el desarrollo de tareas generales de limpieza, observación y registro dentro de los locales. Sin embargo, debe considerarse la recomendación de mantener 300 lúmenes de intensidad lumínica, para áreas de alojamiento de roedores.
- **RUIDO.** Las instalaciones dedicadas al alojamiento de animales de laboratorio deben contar con dispositivos de contención y control de ruido en equipos rodables, carros de servicio y en áreas que generan ruidos excesivos, ya sea de lavado o bien de especies como perros y primates no humanos. La intensidad del ruido no debe ser mayor a 85 dB. El control anterior debe ser alcanzado mediante buenas prácticas de cuidado animal y la orientación del personal de apoyo.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Esther Magdalena Márquez Lona

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería

Genética

Tesis: Efectos toxicológicos de vectores adenovirales en fetos de rata.

Campo de estudio: Terapia Génica.

Biografía.

Lugar de Nacimiento: Guanajuato, Guanajuato.

Fecha: 4 de Febrero de 1972.

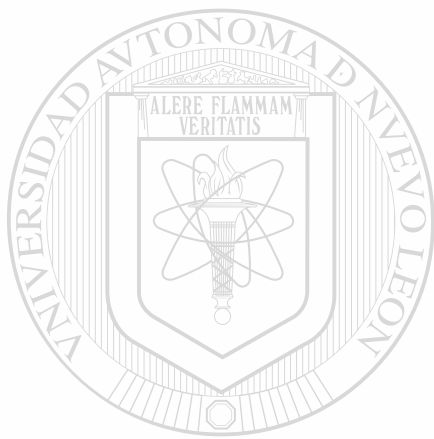
Padres: Profra. Esther Lona Ruíz y M. en C. Manuel Márquez Márquez.

Educación.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guanajuato.

Grado obtenido: Químico Farmacéutico Biólogo.

Fecha: Agosto de 1997.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



