

**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas**  
**y Agropecuarias**



**EFFECTO DE LA PREINMUNIZACIÓN Y LA INMUNOSUPRESIÓN  
TRANSITORIA CON CICLOSPORINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL  
TRANSGEN (uPA) EN LA TERAPIA GÉNICA CON  
ADENOVECTORES EN CIRROSIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL.**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**Mayra Guadalupe Mena Enriquez**

**GUADALAJARA, JALISCO. DICIEMBRE DEL 2005.**

**Dr. Carlos Álvarez Moya.**  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
**Presente**

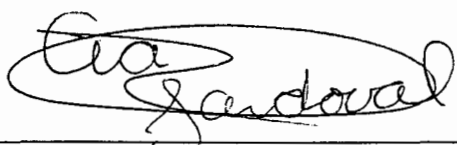
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad *Tesis*, opción *I* con el título: **“Efecto de la pre-inmunización y la inmunosupresión transitoria con ciclosporina sobre la expresión del transgen (uPA) en la terapia génica con adenovectores en cirrosis hepática experimental”** que realizó la pasante **Mayra Guadalupe Mena Enriquez** con número de código **396545088** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Guadalajara, Jal., 8 de Diciembre del 2005.

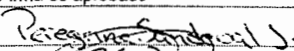
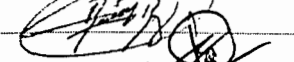




Dr. Juan Armendáriz Borunda  
 Director de Tesis



Dra. Ana Soledad Sandoval Rodríguez  
 Asesor de Tesis

*Handwritten notes:*  
 VOP  
 CUCBA  
 CARLOS ALVAREZ MOYA  
 COORDINADOR DE  
 CARRERA DE  
 BIOLUGIA

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Jorge Peregrina Sandoval		8/dic/05
Ramón Reynoso Orozco		08/dic/05
Alfredo Feria Velasco		09/dic/05
Supl. Anne Santerre Lucas		08/dic/05



**Universidad de Guadalajara**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y  
Agropecuarias**

***Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura  
en Biología***

**370/ C. C. BIOLOGÍA**

**C. MAYRA GUADALUPE MENA ENRÍQUEZ  
PRESENTE**

Manifetamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el titulo : " **Efecto de la pre-inmunización y la inmunosupresión transitorias con Ciclosporina sobre la expresión del transgene (uPA) en la terapia génica con adenovectores en cirrosis hepática experimental**" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el /la: **DR. JUAN ARMENDÁRIZ BORUNDA** y el Asesor /a es: **DRA. ANA SOLEDAD SANDOVAL RODRÍGUEZ.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"**

**Las Agujas, Zapopan., 5 de Diciembre del 2005.**

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**CUCBA**



**BIBLIOTECA CENTRAL**



**COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIATURA EN BIOLÓGIA**

**C.c.p. DR. JUAN ARMENDÁRIZ BORUNDA - Director del trabajo**

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

El presente trabajo se realizó en el *Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica* del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

*Nuestro conocimiento  
es una pequeña isla  
en el enorme océano  
del desconocimiento*

*Isaac Bashevis*

## AGRADECIMIENTOS

***A Dios:***

A ti que flotas entre las nubes y me has permitido concluir esta etapa tan importante en mi vida, eres la estrella que ilumina mi camino, porque se que con tan solo levantar mis ojos al cielo estas ahí, gracias por vivir dentro de mi.

***A mi Familia:***

Las personas más especiales que viven en mi corazón a las cuales les agradezco su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, ustedes son el motor que me impulsa a salir adelante cada día, gracias por ser parte de mis sueños, que Dios los bendiga siempre.

***Al Dr. Juan Armendáriz:***

Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Es una persona que tiene toda mi admiración y respeto.

***A Ana Sandoval:***

Por tu apoyo incondicional, por compartir este lindo trabajo conmigo, por tu amistad, por estar siempre en todo momento, Te admiro mucho.

**GRACIAS!!!**

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	ix
Abreviaturas.....	x
Resumén.....	xii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Cirrosis hepática.....	2
2.1.1 Epidemiología de la cirrosis hepática.....	2
2.1.2 Anatomía normal de un hígado.....	3
2.1.3 Fisiopatología de la cirrosis hepática.....	5
2.2 Células estelares hepáticas.....	6
2.2.1 Activación de las células estelares hepáticas.....	7
2.3 Papel de las Metaloproteasas.....	7
2.4 Características del transgen huPA.....	8
2.4.1 Receptor de uPA.....	9
2.4.2 Inhibidores de uPA.....	10
2.4.3 Construcción de uPA truncado.....	10
2.4.4 $\Delta$ uPA mecanismo de reversión de la fibrosis.....	11
2.5 Mecanismo de daño hepático por CCl <sub>4</sub> .....	12
2.6 Terapia Génica.....	13
2.6.1 Vectores adenovirales.....	13
2.6.2 Adenovirus.....	14
2.6.3 Respuesta inmune contra adenovectores.....	16
2.6.4 Influencia de la respuesta inmune en la terapia génica.....	17
2.6.5 Estrategias de inmunomodulación para la readministración de adenovirus como vectores génicos.....	17

---

2.7 Mecanismo de acción de la ciclosporina.....	18
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Justificación.....	21
5. Hipótesis.....	22
6. Objetivos.....	23
6.1 Objetivo General .....	23
6.2 Objetivos Particulares .....	23
7. Diseño Metodológico .....	24
7.1 Características del estudio.....	24
7.2 Estadística.....	24
7.3 Diagrama de flujo.....	25
8. Diseño experimental.....	26
8.1 Animales.....	26
8.2 Grupos de ratas.....	26
8.3 Modelo experimental de cirrosis hepática.....	26
8.4 Generación de adenovirus recombinantes.....	27
8.5 Administración del adenovector.....	27
8.6 Pre-inmunización de los animales.....	27
8.7 Inmunosupresion de los animales.....	28
8.8 Sacrificio de Animales.....	28
9. Expresión de huPA por ELISA.....	28
9.1 Preparación de homogenados.....	28
9.2 Concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford.....	29
9.3 ELISA para $\Delta$ uPA.....	29
10. Análisis morfométrico.....	30
10.1 Procesamiento de tejidos.....	30
10.2 Tinción tricrómica de Masson.....	30
10.3 Tinción de rojo sirio.....	31
11. Inflamación y daño tisular por la administración del Ad.....	31
11.1 Tinción de hematoxilina y eosina.....	31
12. Resultados.....	32



12.1 Expresión del transgen huPA por ELISA.....	32
12.2 Análisis Morfométrico.....	34
12.3 Inflamación y daño tisular por la administración del Ad.....	37
13. Conclusiones.....	38
14. Discusión.....	39
15. Bibliografía.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estructura de un lobulillo hepático.....	4
2. Trancisión del hígado normal al hígado dañado.....	6
3. Estructura de uPA.....	9
4. Esquema de las modificaciones al DNAC de uPA.....	11
5. Representación del genoma de los adenovectores.....	15
6. Estructura de un adenovirus.....	15
7. Internalización de los adenovirus a la célula.....	16
8. Diagrama de flujo.....	25
9. Expresión de la proteína huPA a las 72 horas.....	33
10. Tinción tricrómica de Masson.....	35
11. Tinción de rojo sirio.....	36
12. Tinción hematoxilina-eosina.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Esquema de los grupos de estudio.....	26
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
AC	Área centrolobular
Ad	Adenovirus
Ag	Antígeno
Ad- $\Delta$ huPA	Vector adenoviral que contiene el cDNA de huPA modificado
APCs	Células presentadoras de antígenos
CaN	Calcineurina
CAR	Receptor de virus de coxsachie y adenovirus
CCl <sub>3</sub> •	Tricloruro de carbono
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CEH	Células estelares hepáticas
CMV	Citomegalovirus
CpN	Ciclofilina
CsA	Ciclosporina A
DC	Celulas dendríticas
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco's
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EP	Espacio periportal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
huPA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa de humano
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gamma
IP-10	Proteína inhibidora 10
ITR	Repeticiones internas terminales
kDa	kilodaltones
KDEL	Tetrapéptido (Lys-Asp-Glu-Leu)

MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteasas de matriz
NF $\kappa$ B	Factor nuclear kappa-B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NK	Células natural killer
PAI	Inhibidor del activador de plasminógeno
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMSF	Fenilmetil sulfonilo
RR	Señal de retención
TCR	Receptor de células T
TGF-B	Factor de crecimiento transformante B
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
uPAR	Receptor del activador de plasminogeno tipo urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## RESUMEN

Los Adenovirus silvestres infectan las vías respiratorias del humano y prácticamente la totalidad de los individuos ha estado expuesta a ellos, por ese motivo desarrollan un estado de pre-inmunización con presencia de anticuerpos neutralizantes y células T de memoria que disminuyen significativamente la eficiencia de transducción a las células blanco y la expresión del transgen en una segunda exposición. Una de las estrategias de terapia génica contra la cirrosis hepática desarrolladas por nuestro equipo de trabajo se basa en el uso de vectores adenovirales conteniendo el gen del activador de plasminógeno tipo urocinasa humano (huPA); que logró disminuir un 33-85% la fibrosis en los modelos de cirrosis hepática experimental y una expresión del transgen de por lo menos 10 días. Nuestro objetivo es la aplicación de estos desarrollos biotecnológicos en protocolos clínicos en un futuro cercano; por lo que consideramos necesario valorar primeramente en modelos experimentales de cirrosis el uso de un fármaco inmunosupresor como una estrategia para disminuir la respuesta inmune pre-existente contra el adenovirus, en animales cirróticos con un estado de pre-inmunización, logrando con ésto una mayor eficiencia en la expresión del transgen. La inducción de cirrosis se realizó por administración de  $\text{CCl}_4$  durante 8 semanas. Cada grupo incluye cinco animales; y fueron constituidos por ratas sanas, cirróticas, cirróticas inmunosuprimidas y cirróticas pre-inmunizadas con y sin inmunosupresión. La preinmunización se realizó a la quinta semana de administración de la hepatotoxina usando una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/totales de Ad- $\Delta$ uPA administrados por vena ilíaca. En la octava semana los grupos correspondientes fueron inmunosuprimidos con 40 mg/kg de Ciclosporina durante tres días (24 horas antes, durante y después de la administración del adenovector). Todos los grupos fueron administrados con  $3 \times 10^{11}$  pv/totales del Ad- $\Delta$ uPA. El sacrificio de los animales se realizó a las 72 horas. Se determinó la presencia de la proteína en homogenado de hígado, bazo, pulmón, riñón, corazón, cerebro y testículo por ELISA y se valoró la reversión de la fibrosis por Análisis Morfométrico. El valor máximo de la proteína uPA fué detectada; en el grupo de

animales sanos, específicamente en hígado (45 ng/mg de proteína). En el resto de los grupos, la proteína se detectó en tejido hepático, bazo y riñón en una cantidad 10 veces menor que en el grupo de animales sanos, observándose una disminución en los animales pre-inmunizados que sólo alcanzaron niveles de 50-150 pg/mg de proteína. La proteína no se detectó en el resto de los tejidos. La reversión de la fibrosis que se logra con la administración de AduPA en los grupos cirróticos y cirróticos pre-inmunizados es notable respecto a las ratas cirróticas sin tratamiento, aún con solo 72 horas de expresión de la proteína terapéutica. La reversión de la fibrosis se vio afectada por la preinmunización y la inmunosupresión, ya que los grupos sensibilizados y/o inmunosuprimidos muestran a los 3 días posteriores a la administración de Ad-hΔuPA una cantidad ligeramente mayor de tejido fibroso.

En base a estos resultados, planeamos evaluar parámetros de la respuesta inmune que puedan estar influyendo en este fenómeno para utilizarlos en trabajos posteriores.

CUCBA



BIBLIOTECA

## 1. INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática se considera un grave problema de salud al ser la segunda causa de muerte en edad productiva en nuestro país. Las etiologías predominantes para esta patología son la ingesta excesiva de alcohol y las infecciones dadas por los virus de la hepatitis B y C. La cirrosis es el resultado de un ataque crónico al hígado, en donde el parénquima hepático es remplazado por tejido fibroso, produciendo así una alteración en la función hepática y cambios en la arquitectura del hígado.

Una de las estrategias terapéuticas para esta patología involucra la terapia génica con el gen de ( $\Delta$ huPA) enviado en un vector adenoviral, para activar mecanismos que inducen la degradación de la matriz extracelular y estimulan la proliferación de hepatocitos al inducir la expresión de factores de crecimiento como HGF logrando con esto un restablecimiento acelerado del hígado. El gen humano de uPA fue modificado para producir una forma no secretable de la proteína por lo que se evita la tendencia a sangrados internos. En su forma silvestre los adenovirus infectan las vías respiratorias del humano y prácticamente la totalidad de la población ha estado expuesta a ellos, desarrollando un estado de preinmunización que se caracteriza por la presencia de anticuerpos neutralizantes y células T de memoria, lo que podría disminuir significativamente la eficiencia de transducción a las células blanco y la expresión del transgen en su aplicación como vectores génicos. Consideramos que para la aplicación clínica de esta terapia es necesario evaluar el efecto de la pre-inmunización a los adenovirus sobre la expresión del gen terapéutico y analizar las posibles ventajas de una estrategia de inmunosupresión temporal con la finalidad de favorecer la expresión hepática.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática (del griego *kirrós*; amarillo, por la coloración típica producida por la acumulación de bilis) es la etapa final de la fibrosis del parénquima hepático que resulta en la formación de una matriz cicatrizal, nódulos de regeneración y pérdida de la función hepática. La cirrosis es la respuesta a un daño hepático crónico por una amplia variedad de etiologías (1).

#### 2.1.1 Epidemiología de la Cirrosis Hepática

En México, la cirrosis hepática es la segunda causa de muerte en edad productiva según las estadísticas de la Secretaría de Salud para el año 2003. Afecta en mayor medida a los hombres para quienes es la tercer causa de muerte, mientras para las mujeres constituye la octava (2).

Las etiologías predominantes para esta patología son la ingesta excesiva de alcohol y las infecciones virales dadas por virus de hepatitis C y B; y en menor medida las desarrolladas por el consumo de fármacos hepatotóxicos, autoinmunidad, trastornos en el sistema de drenaje del hígado y trastornos metabólicos de hierro (hemocromatosis) y la enfermedad de Wilson (3). La cantidad de alcohol necesaria para producir enfermedad hepática es variable. En mujeres, el consumo de alcohol debe ser mayor de 20g/día y en hombres 60g/día (4). Respecto a los virus de hepatitis; hasta un 90% de los pacientes infectados con el virus C evolucionan a una infección crónica y con ello en un periodo promedio de 10 años pueden llegar a desarrollar cirrosis. Por el contrario, con el virus de hepatitis B un porcentaje mínimo de los pacientes llegan a infección crónica y a un daño hepático severo como la fibrosis (5). Debido a que más del 40% de los pacientes con cirrosis son asintomáticos, pueden permanecer así por más de una década, llegando a detectarse la patología hasta etapas avanzadas (1).

### 2.1.2 Anatomía normal de un hígado

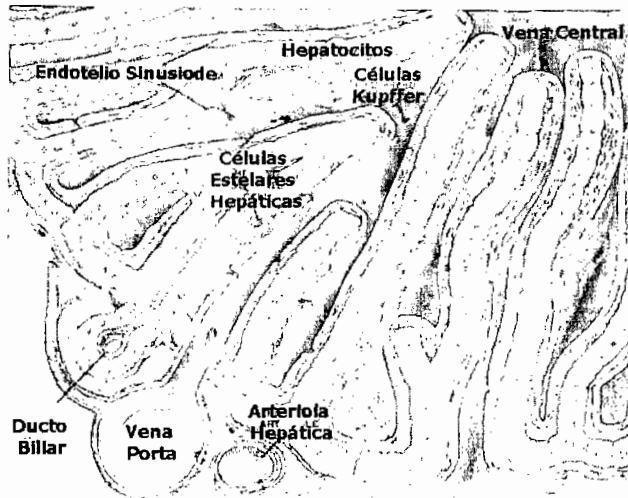
El hígado es la víscera de mayor tamaño del organismo y su peso en el individuo adulto es de unos 1,500 g. Está formado por dos lóbulos principales de los cuales el derecho es más grande que el izquierdo. El color café rojizo de este órgano se debe a la cápsula de tejido conectivo que lo cubre (3).

Ocupa una posición fisiológica fundamental, pues se halla interpuesto entre la corriente sanguínea que proviene del intestino y el resto del organismo. Al hígado llega la vena porta, la cual transporta los compuestos absorbidos en el intestino y estómago, incluyendo sustancias que podrían causar toxicidad. Al hígado lo irriga la arteria hepática, que transporta hasta un 25% del gasto cardiaco y se encarga de oxigenar todo el tejido hepático. Del hígado salen vasos linfáticos y dos ductos biliares (uno de cada lóbulo). Los dos ductos biliares se unen entre sí para luego unirse al ducto cístico proveniente de la vesícula biliar, entonces forman un solo conducto que viaja hasta el duodeno, donde descarga la bilis producida.

La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático, está formado por tres ductos (la vena portal, la arteria hepática y el ducto biliar) y los hepatocitos que los rodean. Los vasos se dirigen del Espacio Periportal (EP) al Área Centrolobular (AC). En el EP existe una mayor concentración de oxígeno, por lo que las sustancias que se bioactivan por medio de oxigenación son más peligrosas en esta área. En el AC la concentración de oxígeno es menor y como la concentración de citocromo P-450 es alta, existen las condiciones para que se presenten reacciones de reducción catalizadas por esta enzima. Las sustancias que se bioactivan en estas condiciones pueden producir daño en esta región. Un ejemplo es el  $\text{CCl}_4$  que es tóxico en esta área (6).

En el hígado se distinguen diversos componentes celulares como los parenquimatosos (hepatocitos), endoteliales (células epiteliales del sinusoides que forman fenestraciones), macrófagos tisulares (denominados células de Kupffer) y células mesenquimales perivasculares o CEH. Los hepatocitos están organizados en cordones radiados alrededor de la vena central. Entre estas líneas de

hepatocitos y el sinusoides se presenta un espacio denominado de Disse, que contiene una membrana basal compuesta de colágenas no fibrilares tipo IV, V, VI, XIII y XIV, fibronectina, laminina, entactina y proteoglicanos. Es ahí donde se localizan las CEH almacenadoras de retinoides (Figura 1). Este re-arreglo tiene como finalidad facilitar el intercambio de nutrientes entre la sangre circulante y los hepatocitos (1).



**Figura 1. Lobulillo hepático.** Es la unidad funcional del hígado; se forma por los cordones de hepatocitos que irradian desde la vena central hacia la triada portal (ducto biliar, la arteriola hepática y la vena portal). Tomada de Friedman 2003.

El hígado ejecuta un gran número de funciones, entre las más importantes están el almacenamiento de las sustancias que recibe por medio del torrente circulatorio y el sistema portal, el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños. Además, realiza funciones como la formación de la bilis, el almacenamiento de vitaminas y hierro y la formación de factores de coagulación. Para realizar sus funciones, el hígado cuenta con una gran cantidad de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales se encuentran el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavin-monooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas (7). El proceso de regeneración hepática es un mecanismo constante y complejo; está finamente estructurado, y se ven involucrados diferentes tipos de poblaciones celulares, ocurriendo una interacción entre factores de crecimiento, citocinas, componentes de la matriz extracelular y otros reguladores (8).

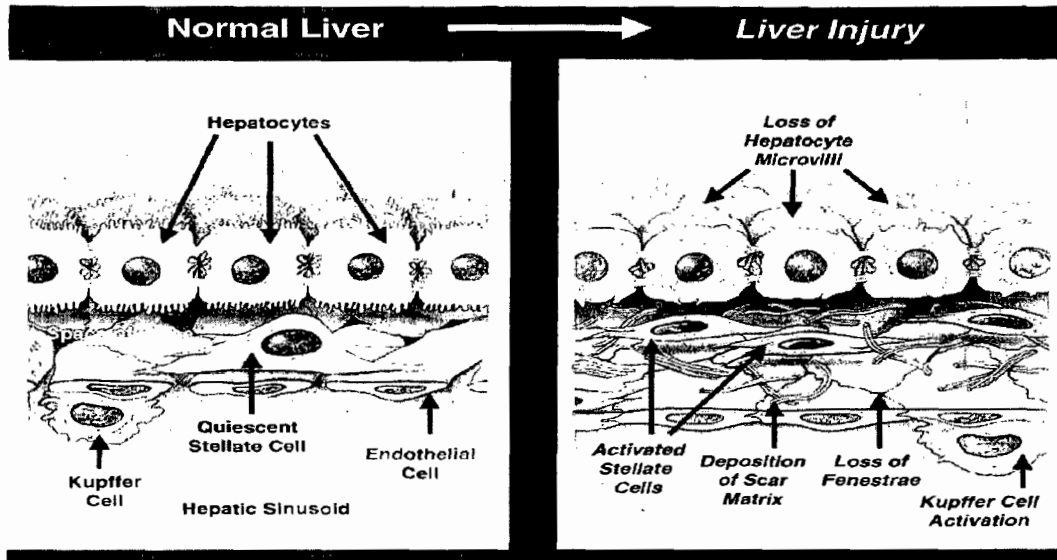
### 2.1.3 Fisiopatología de la Cirrosis Hepática

El hígado tiene una irrigación eminentemente dada por la vena porta y por la arteria hepática, por lo que la presencia de patologías hepáticas alteran esta irrigación. Además, el hígado tiene una capacidad única de regeneración, ya que regula su crecimiento y su masa tanto en animales como en humanos. Este órgano tiene lo que nosotros llamamos una gran reserva funcional; esta cualidad puede ser benéfica o no, dependiendo del punto de vista que se vea: una gran reserva funcional finalmente lleva a presentar síntomas o signos solo cuando más del 80% del hígado está comprometido, esto hace que la enfermedad hepática cuando se manifiesta en general sea grave. El hígado tiene alrededor de 1,500 funciones, por lo que la alteración de la función del hepatocito repercutirá en el funcionamiento de todo el organismo (2).

La cirrosis se caracteriza por una alteración de la función hepática y cambios en la arquitectura del hígado. Es el resultado de padecimientos crónicos del hígado, acompañados por un proceso de inflamación en donde el parénquima hepático es remplazado en forma paulatina por tejido fibroso, de manera que los hepatocitos funcionales, quedan aislados (3). Las manifestaciones clínicas se atribuyen a la disfunción hepatocelular progresiva y a la hipertensión portal; e incluyen elevación de varios marcadores funcionales como las enzimas alaninoamino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), albúmina, bilirrubinas, así como la presencia de varices esofágicas, ascitis y en algunos casos hepatocarcinoma (9).

A nivel celular, el espacio de Disse normalmente compuesto por una membrana basal poblado de células estelares en reposo, pasa a ser ocupado por una cicatriz fibrótica compuesta de colágenas fibrilares (principalmente tipo I, III y IV) que forman una matriz extracelular densa. El epitelio del sinusoides pierde sus fenestraciones y esta capilarización dificulta el intercambio de sustancias entre éste y los hepatocitos, que además pierden sus vellosidades (Figura 2).

Es considerado, que la fibrosis es el resultado de un desbalance entre la síntesis exacerbada de colágenas y la reducción de la expresión y/o activación de metaloproteasas (MMPs) capaces de degradar colágenas, y la inhibición específica de estas colagenasas activadas por los TIMP's (del inglés *Tissue Inhibitors of Metalloproteases*) (10).



**Figura 2. Transición del hígado normal al hígado dañado.** En el espacio de Disse las células estelares, sufren un proceso de activación y comienzan a producir colágena que se deposita en la matriz extracelular haciéndola más densa, la membrana basal se engrosa y se pierden las fenestraciones de los capilares (Friedman, 2000).

## 2.2 LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS

Las CEH conocidas anteriormente como células de Ito, se localizan en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células endoteliales. Tienen un papel central en el desarrollo de la fibrosis hepática debido a que sintetizan y secretan gran cantidad de componentes de la matriz extracelular como colágena tipo I, III, IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos. Comprenden el 15% del número total de células residentes en el hígado y en su fenotipo normal son las principales almacenadoras de retinoides (vitamina A) (11).

En condiciones normales participan en la remodelación de la matriz extracelular, producción de metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento y citocinas. Sin embargo, cuando hay un daño en el hígado producen citocinas inflamatorias y fibrogénicas como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-6 (*Interleucina-10* y 6) y sufren un proceso de

“activación” que es la transición de células en reposo a células con un fenotipo miofibroblástico, proliferativo y contráctil (12).

### **2.2.1 Proceso de activación de las CEH**

La activación de las CEH es un proceso que comprende 2 etapas; iniciación y perpetuación.

La iniciación es un estado pre-inflamatorio que comprende cambios rápidos en el fenotipo y expresión de genes, en el que las células responden a citocinas y otros estímulos. Esto es resultado de estímulos parácrinos debido al desequilibrio en la homeostásis del hígado y a cambios tempranos en los componentes de la matriz extracelular.

La perpetuación incorpora estos eventos celulares y amplifica el fenotipo activado a través de la respuesta y secreción de citocinas; estos componentes de la activación son el resultado de estímulos parácrinos y autócrinos, así como de cambios acelerados en la remodelación de la matriz extracelular (13).

### **2.3 PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS**

Las metaloproteasas son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que participan en procesos de remodelación tales como el desarrollo embrionario, implantación uterina, ovulación y curación de las heridas. Estas proteasas se han asociado con un número importante de enfermedades como la artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedades cardíacas y cáncer. Cada enzima presenta afinidad por una variedad de sustratos, sobre los cuales actúan, pero en conjunto esta gran familia de proteasas degradan todos los componentes de la MEC. La clasificación de cada enzima está dada por sus características funcionales estructurales y su especificidad por el sustrato (14).

La mayoría de los miembros de la familia de MMPs constan de 3 dominios: un propéptido amino-terminal, un dominio catalítico, y un dominio carboxilo-terminal tipo hemopexina. El propéptido (80-90 a.a.) contiene una secuencia altamente conservada PRCG(V/N)PD, en la cual la cisteína dentro de esta secuencia está ligada al zinc del dominio catalítico y es crítica para mantener la latencia de la

enzima. El dominio catalítico (170 a.a.) consta de 5 hojas  $\beta$  plegadas, tres hélices  $\alpha$  y dos bucles (del inglés *loops*) de unión. El dominio C-terminal (210 a.a.), tiene una apariencia de hélice con cuatro laminas tipo  $\beta$ , cada una de estas está compuesta por cuatro hojas  $\beta$ -plegadas y una hélice  $\alpha$  (15).

Las MMPs son producidas por una gran variedad de células y son secretadas en una forma inactiva (pro-MMPs) se activan a través de un corte proteolítico del propéptido por algunas proteasas como la plasmina (16).

La actividad catalítica de las MMPs es regulada a múltiples niveles incluyendo transcripción, secreción, activación e inhibición. Lo último es llevado a cabo por los TIMPs, que forman parte de una familia de proteínas pequeñas (21-28 kDa) multifuncionales de las cuales se han descrito cuatro; TIMP-1, 2,3 y 4. La unión de los TIMPs al dominio catalítico de las MMPs resulta en una inhibición eficiente de su actividad enzimática (17).

El TIMP 1 y 2 inhiben las formas activas de las MMPs y al hacerlo participan de manera importante en la acumulación de la MEC. El balance entre la producción de MMPs y TIMPs representa un punto crítico en el mantenimiento de la homeostasis de la MEC. Es por ello que juegan un papel relevante en procesos fisiopatológicos (18).

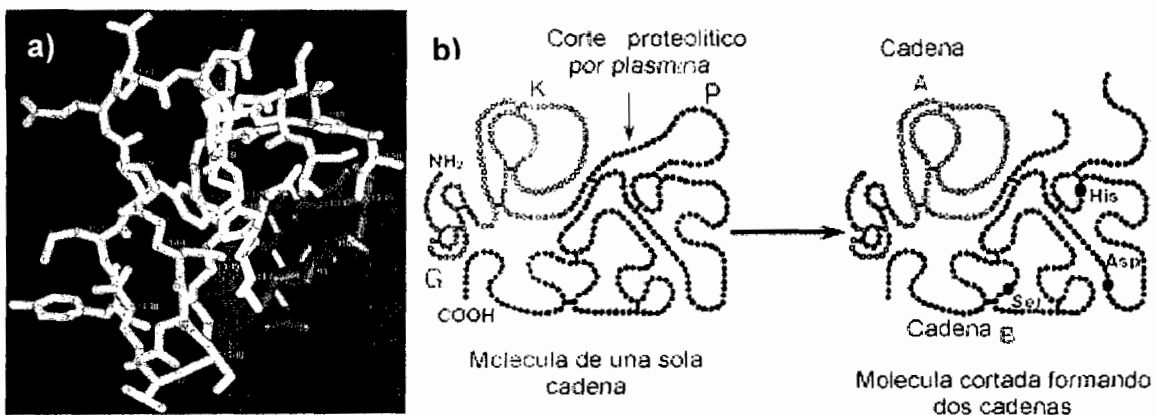
## **2.4 CARACTERÍSTICAS DEL TRANSGEN h-uPA**

El activador de plasminógeno tipo urocinasa humano (uPA) participa en procesos fisiológicos y patológicos tales como fibrinólisis, ovulación, remodelación de tejido, migración celular y angiogénesis así como en la invasión de células tumorales y metástasis. El uPA es un importante componente del sistema de proteasas porque convierte específicamente el plasminógeno a plasmina (19).

El término urocinasa hace referencia a la orina, de donde fue purificado por primera vez, se encuentra de manera soluble en plasma en una concentración de 2-20 ng/ml. El gen para uPA se encuentra en el cromosoma 10 en humanos, contiene 11 exones y mide 6.4 kb. El uPA es secretado por células endoteliales, células del músculo liso, células epiteliales, fibroblastos y monocitos, como un

polipéptido de cadena sencilla (pro-uPA) con un peso molecular de 54 kDa que consiste en 411 a.a (20).

La estructura de uPA está subdividida en tres dominios: el dominio amino-terminal que es un dominio homólogo al factor de crecimiento epidermal (EGF) con 9-45 a.a. El dominio bisagra (46-143 a.a.) y el dominio catalítico en la región carboxilo-terminal (144-411 a.a.). El dominio EGF es responsable de la interacción del uPA con su receptor uPAR y el dominio bisagra contiene una secuencia que interactúa con el inhibidor específico (PAI-1). El pro-uPA es convertido a su forma activa de doble cadena (A y B) por plasmina a través de un corte entre los aminoácidos Lys<sup>158</sup>-Ile<sup>159</sup>. Otras proteasas extracelulares como la calicreína, el factor de coagulación Xlla y la catepsina B, pueden activar también a uPA (Figura 3) (21).



**Figura 3. Activador de plasminógeno tipo urocinasa.** a) Estructura tridimensional en barras b) Isoformas de una y dos cadenas. G: Dominio "factor de crecimiento" (por su homología con el factor de crecimiento epidérmico), K: Dominio bisagra, P: Dominio catalítico (Sato 1996).

### 2.4.1 Receptor de uPA

El uPA tiene un receptor específico en la superficie celular el cual tiene un peso molecular de 55-60 kDa y contiene 283 a.a. La unión de uPA a su receptor uPAR intensifica la activación del plasminógeno sobre la superficie celular. El receptor se une a uPA de cadena sencilla y este se activa más eficientemente que de forma libre. Además, uPAR protege a uPA de una posterior degradación por plasmina incrementando así la vida media de uPA en la superficie celular (22).



### **2.4.2 Inhibidores de uPA**

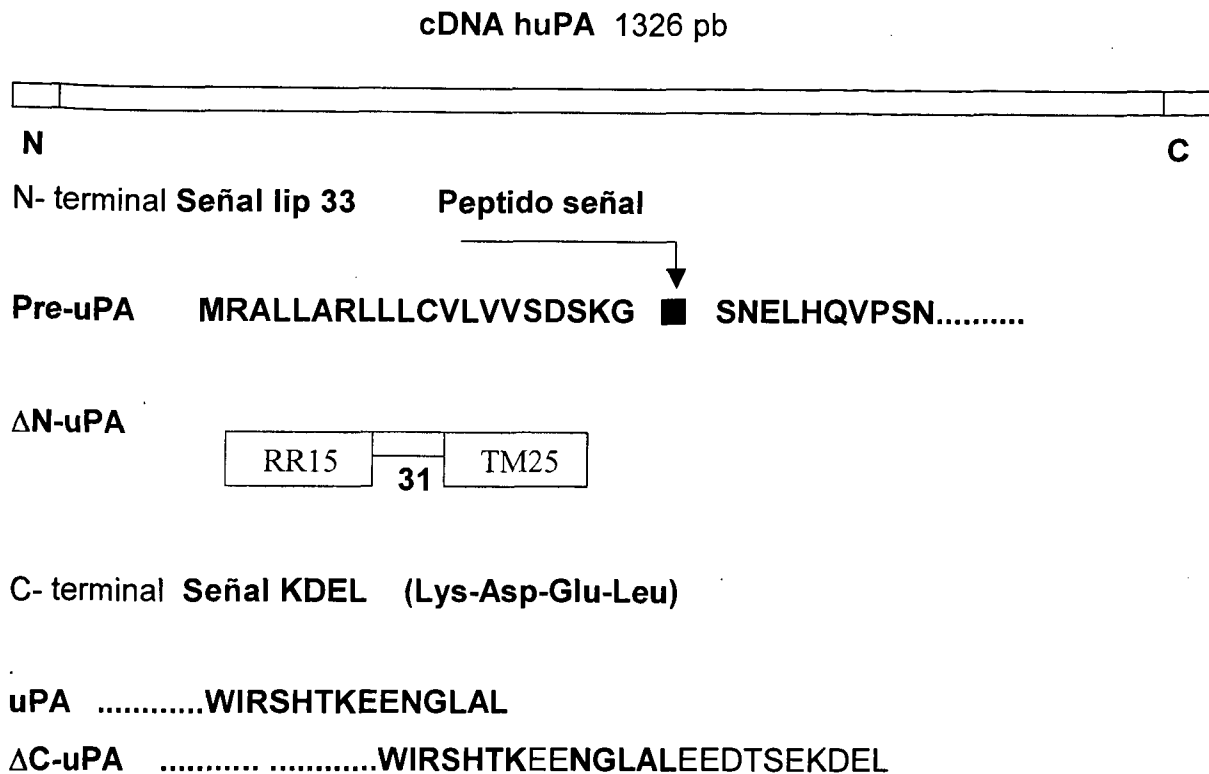
Se conocen dos proteínas inhibidoras con especificidad para uPA, que desempeñan un papel importante en la regulación de la fibrinólisis. El PAI-1 se encuentra presente en el plasma en una concentración de 1nM y es secretado por el endotelio vascular.

Las citocinas que activan a las células endoteliales en los estados inflamatorios incrementan la liberación de PAI-1 de esta fuente, y sus niveles se elevan después de una cirugía mayor y otros tipos de traumatismo tisular. El PAI-1 inhibe al uPA de dos cadenas, pero no inhibe al uPA de cadena sencilla. El PAI-2 puede funcionar primariamente para modular la activación del plasminógeno en los tejidos. La unión del uPA con su receptor parece protegerlo contra la inactivación por PAI-2; lo cual ayuda a limitar la activación del plasminógeno en la superficie de las células (3).

### **2.4.3 Construcción de uPA truncado**

Con la finalidad de evitar la secreción transitoria de uPA a la corriente sanguínea lo que podría conducir a una hipocoagulación. El DNAC de uPA fue modificado añadiendo en el extremo carboxilo terminal una señal (KDEL, tetrapéptido presente en proteínas animales que previene la vía de secreción) de retención en retículo endoplásmico y en el extremo amino terminal una señal de retención (RR) y de anclaje transmembranal (TM) de la proteína de levadura lip 33.

Con estas adiciones el DNAC de uPA humano (1326 pb) fue extendido en 75 nucleótidos en el extremo 3' y para la modificación  $\Delta$ N-uPA se eliminaron 25 aminoácidos los cuales fueron remplazados con la secuencia para las señales RR y TM, ambas separadas por un péptido irrelevante de 31 a.a. (Figura 4) (23).



**Figura 4. Modificaciones al DNAc de huPA.** Se añadió en el extremo amino terminal una señal de retención transmembranal de la proteína lip33 y en el extremo carboxilo la señal KDEL para construir una forma no secretable de la proteína.

#### 2.4.4 ΔuPA mecanismo de reversión de la fibrosis

El ΔuPA promueve una cascada de eventos que activa las metaloproteasas latentes que conducen a la degradación de la MEC en el espacio de Disse y por otro lado el ΔuPA directamente o por vía de la plasmina puede activar o liberar de la matriz extracelular un número de factores de crecimiento como: el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), todo esto para restablecer la masa hepática y activar las vías de señalización intracelular que regulan el comportamiento celular (22).

## 2.5 MECANISMO DE DAÑO HEPÁTICO POR CCl<sub>4</sub>

El efecto tóxico del CCl<sub>4</sub> se debe a su transformación por el citocromo P-450 en los productos: CCl<sub>3</sub> • (tricloruro de carbono) + Cl<sup>-</sup>, de los cuales el radical libre CCl<sub>3</sub> • es tóxico y altamente reactivo con una variedad de moléculas intracelulares, principalmente los ácidos grasos insaturados que constituyen la membrana celular y la de organelos (24). En hepatocitos, el tricloruro produce daño mediante peroxidación de lípidos de la membrana plasmática y mitocondrial, ocasionando muerte celular con la consecuente pérdida de la funcionalidad del hígado (25).

Este modelo se caracteriza por necrosis masiva de hepatocitos, principalmente alrededor de las venas centrales y en menor grado alrededor de las triadas portales, por reclutamiento de monocitos-macrófagos de la circulación hacia las zonas dañadas en el hígado y por proliferación de células de Kupffer (26).

En menos de 30 minutos, se produce una disminución en las síntesis de proteínas hepáticas y, a las dos horas, edema del retículo endoplásmico liso y disociación de los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. Después se produce la lesión mitocondrial y ésta va seguida por un aumento del volumen de las células debido al incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, la cual se cree es causada por aldehídos grasos relativamente estables, que son producidos por la peroxidación lipídica del retículo endoplásmico liso, pero son capaces de actuar en lugares distantes. Ello va seguido por una entrada masiva de calcio y muerte celular (27).

Este modelo simula el daño al hígado ocasionado por infección crónica con el virus de hepatitis C o por consumo excesivo de alcohol (28).

## **2.6 TERAPIA GÉNICA**

La terapia génica se puede definir como un método para introducir DNA exógeno dentro de las células con la finalidad de producir un cambio transitorio o estable dentro de ellas, y de esa manera modificar su función. La idea original de la terapia génica estaba dirigida a tratar desordenes monogénicos. Sin embargo, actualmente un gen puede ser considerado como un nuevo agente "terapéutico" para tratar variadas patologías en las que esté involucrado. Se ha obtenido información importante de protocolos preclínicos y clínicos, en cuanto a los beneficios y la seguridad de las diversas estrategias utilizadas para el envío de genes. Los protocolos clínicos registrados en la actualidad incluyen patologías como cáncer, SIDA, enfermedades metabólicas, infecciosas, neuro-degenerativas entre otras (29).

### **2.6.1 Vectores adenovirales**

Los adenovirus (Ad) son virus de DNA ampliamente utilizados en terapia génica; su aislamiento en 1953 a partir de tejidos adenoides de niños dio origen a su nombre (30). A los adenovirus recombinantes usados como vectores se les han eliminado regiones de su genoma con la finalidad de inhibir su replicación. Debido a que no se integran en el genoma del huésped, estos virus solo expresan el transgen en forma temporal durante su estancia en la célula. Los adenovirus deben su uso exitoso al hecho de su seguridad biológica, ya que en forma natural en el humano solo se les ha relacionado con padecimientos respiratorios y gastrointestinales (31).

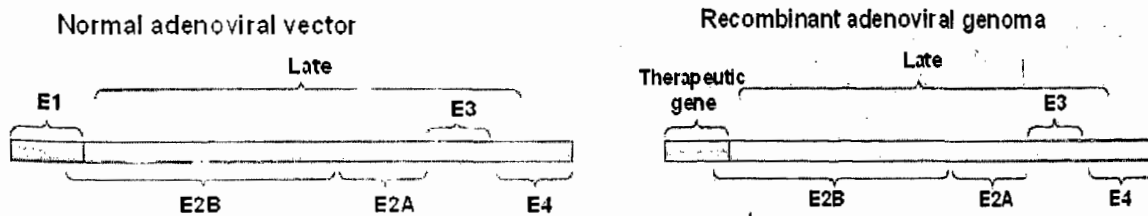
Los Adenovirus tipos 2 y 5 (Ad2 y Ad5) son los más utilizados como vectores génicos. Su producción es relativamente sencilla lo que ha facilitado una administración eficiente *in vivo*. Estos virus tienen además la capacidad de infectar un amplio espectro de células eucariotas, tanto en reposo como en división.

El principal inconveniente para su utilización en el envío de genes, es la fuerte respuesta inmunológica que despiertan, caracterizada por una intensa inflamación así como por activación de linfocitos T citotóxicos (32).

En un intento por aminorar la intensidad de la respuesta inmune inducida en el huésped por el adenovirus se han escindido extensas porciones en el genoma viral, esto ha generado una clasificación de los adenovirus recombinantes por generaciones; todos presentan escindida la región E1, encargada de la replicación viral, la cual es sustituida por el gen terapéutico deseado, la última estrategia de modificación generó los llamados adenovirus *gutless*, los cuales carecen de prácticamente todo el genoma viral con excepción de las regiones ITR (del Inglés, *Internal Terminal Repeats*) que contiene la señal  $\psi$  indispensable para el empaquetamiento viral, pero no expresan otras proteínas virales; generando por ende una menor respuesta inmunológica (33).

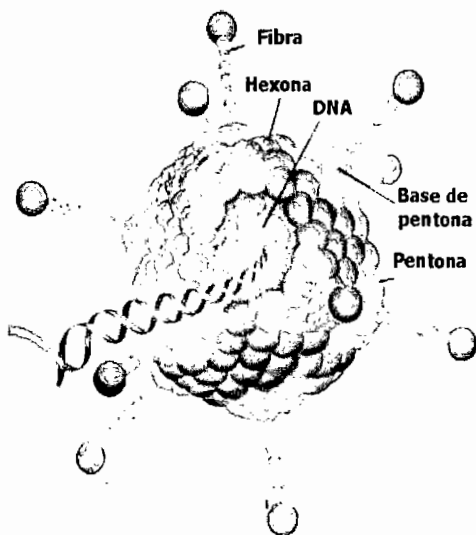
### 2.6.2 Adenovirus

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* y existen 4 géneros, de los cuales los adenovirus que infectan al humano pertenecen al *Mastadenovirus*. Para el humano se han identificado hasta el momento más de 50 serotipos. Los adenovirus carecen de envoltura, su genoma es una doble cadena de DNA con longitud de 30-38 Kb, según el serotipo y se divide en regiones de genes tempranos (E1-E4) y tardíos (L1-L5). Los genes E1, E2 y E4 codifican para proteínas reguladoras de la replicación del virus y modulan el metabolismo celular haciendo más susceptible la replicación viral. E3 es un gen no-esencial para replicación involucrados en procesos inmunomodulatorios (34). Los genes tardíos codifican para proteínas estructurales de la cápside viral y para señales de maduración y encapsidación (Figura 5). El genoma se encuentra flanqueado por dos regiones en horquilla conocidas como ITR's y contienen los orígenes de replicación y una secuencia rica en A-T necesaria para el empaquetamiento del virión (señal  $\psi$ ).



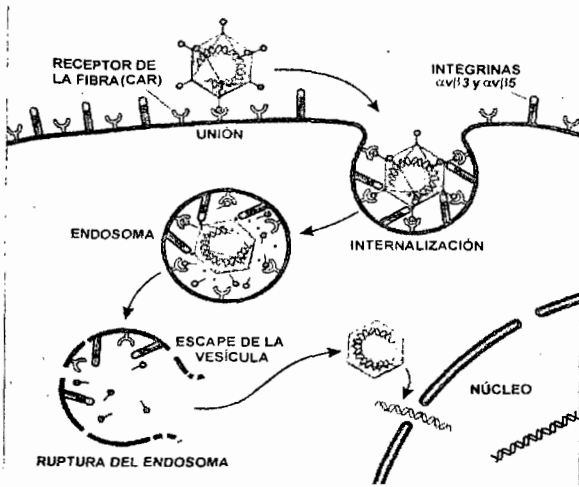
**Figura 5. Representación del genoma de los adenoveectores.** Los adenovirus silvestres constan de una cadena doble de DNA de 35 Kb, y se divide en regiones de genes tempranos (E1-4) y tardíos (L1-5). El gen terapéutico sustituye a la región E1 del genoma viral, al ser eliminada esta región el adenovirus es incapaz de replicarse por si mismo (Douglas, 1997).

La estructura de los viriones es icosaédrica y esta constituida por 240 proteínas denominadas hexonas que conforman la mayor parte de la cápside, la cual tiene 12 vértices y en la base de los mismos proteínas pentonas que anclan en esta estructura a la proteína llamada fibra, la cual esta formada a su vez por la región del tallo, eje y perilla (Figura 6).



**Figura 6. Estructura del adenovirus.** Los Ad carecen de envoltura, su cápside se compone de 252 capsómeros, divididos en 240 hexonas y 12 pentonas, acomodadas en una estructura icosaédrica. De las pentonas se proyectan las fibras que están constituidas a su vez por la región del tallo, eje y perilla.

La unión del virus a la célula se realiza a través del receptor CAR (*Coxsackie virus Adenovirus Receptor*) e Integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  que funcionan como co-receptores. Una vez internalizado el virión se forma una vesícula la cual está recubierta de catrina, posteriormente el endosoma degrada parcialmente al virión, pero por mecanismos de escape logra evadirlo y transportarse a los poros nucleares donde libera su genoma al núcleo para iniciar la transcripción viral (Figura 7) (35).



**Figura 7. Internalización de los Adenovirus.** El virus se une a la célula a través del receptor CAR e integrinas. Una vez dentro de la célula el virus escapa de la lisis del endosoma, llega al núcleo y libera su genoma (Douglas 1997).

### 2.6.3 Respuesta inmune contra adenovectores

La respuesta inmune innata que se despierta contra los adenovirus es dosis dependiente y es inducida por las proteínas de la capsida o por la producción de los genes adenovirales. Esto provoca la secreción de defensinas por las células epiteliales, las primeras en entrar en contacto con los virus, además se liberan quimiocinas (IP-10 y RANTES) para atracción de diversas células del sistema inmune como neutrofilos, macrófagos, células dendríticas y NK's (31). Por otras vías se activa el complemento (36). Existen reportes de activación directa de NFκB, que conduce a la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-10. Todo esto contribuye a perpetuar la respuesta inflamatoria y a reclutar células inflamatorias adicionales (37).

La respuesta inmune específica incluye la subpoblación de células T CD4<sup>+</sup> que al reconocimiento del péptido viral comienzan a proliferar y a secretar citocinas. Las células CD4<sup>+</sup> se diferencian en células tipo Th1 o Th2. Las Th1 secretan predominantemente INF-γ, que juega un papel importante en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs). Los CTLs han mostrado ser los responsables para la eliminación de células transducidas *in vivo*, por mecanismos efectoros que involucran Fas-FasL y granzima-perforina. Las Th2, por otro lado secretan IL-4 que ayuda a los linfocitos B a diferenciarse en células plasmáticas que secretan

anticuerpos (Ac). La presencia de Ac neutralizantes bloquea la readministración del vector (38).

#### **2.6.4 Influencia de la respuesta inmune contra los Ad en la terapia génica**

Los Ad silvestres infectan las vías respiratorias del humano y prácticamente la totalidad de los individuos ha estado expuesta a ellos, por lo que hasta un 90% de la población se reporta en un estado de pre-inmunización (39).

En las estrategias de terapia génica ésta respuesta inmune pre-existente afectará la eficiencia de transducción, la producción del transgen y por tanto la expresión de la proteína terapéutica.

En poblaciones como la de Estados Unidos se reporta presencia de anticuerpos neutralizantes (aquellos capaces de impedir la transducción) desarrollados contra la cápside del virus, (en particular contra las proteínas fibrilares) en porcentajes de hasta un 55-60% (38).

Por otro lado, las células T de memoria intensifican la defensa inmune al eliminar las células transducidas impidiendo la generación de la proteína exógena. En algunas patologías la administración de una dosis única de adenovirus recombinantes podría no ser suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado, por lo que de requerirse una segunda administración los anticuerpos desarrollados, junto con las células T de memoria disminuirían significativamente la eficiencia de transducción a las células blanco y por tanto la expresión del transgen (40).

#### **2.6.5 Estrategias de inmunomodulación para la readministración de adenovirus como vectores génicos**

La elevada respuesta inmune que se desarrolla contra estos vectores ha limitado su aplicación clínica. La inducción de tolerancia oral, inmunomodulación con anti-ligando de CD40 y CTLA4Ig, protección del vector con liposomas catiónicos, modificación de la capsida con polietilenglicoles e inmunosupresión con diversos fármacos son algunas de las estrategias que han logrado disminuir la respuesta



inmune humoral y/o citotóxica que se despierta contra estos virus, o bien incrementar la duración de la expresión del gen terapéutico (35).

## 2.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CICLOSPORINA

La Ciclosporina (CsA) es un fármaco inmunosupresor ( $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ ) descubierto en 1970 como un derivado natural del hongo *Tolypocladium inflatum* que tiene la capacidad de inhibir la respuesta celular y humoral; actúa en etapas tempranas en la diferenciación de células T y bloquea su activación. La CsA se une y forma un complejo con la proteína intracelular Ciclofilina (CpN), y se unen a la calcineurina (CaN). La CaN es capaz de defosforilar el NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) citoplásmico y con esto el factor transcripcional puede translocar al núcleo. La unión del complejo CsA-CpN inhibe la actividad de la CaN y por tanto la movilización a núcleo de NFAT y con esto la transcripción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-1, IL-3, TNF, IFN- $\gamma$  entre otras. La CsA produce una inhibición específica y reversible de linfocitos inmunocompetentes en la fase G0 o G1 del ciclo celular (41). La Ciclosporina es soluble en lípidos o solventes orgánicos, pero insoluble en agua. Se metaboliza en hígado por el sistema de citocromo P-450. Algunos efectos secundarios reportados incluyen elevación de la presión sanguínea, daño renal, temblores, dolor de cabeza, convulsiones, crecimiento excesivo del cabello y encias, confusión, coma y gota (42).

En base a estos conocimientos consideramos necesario evaluar el efecto de la pre-inmunización y de la inmunosupresión transitoria con ciclosporina en la expresión del transgen como una estrategia que nos permita el incremento de la misma.

Las estrategias de terapia génica para la cirrosis hepática desarrolladas por nuestro equipo de trabajo se basan en el uso de vectores adenovirales que contienen el gen huPA.

La administración única de  $3 \times 10^{11}$  pv/kg vía vena ilíaca logró la reversión de la cicatriz fibrótica en un 33-85% del tejido en el modelo de cirrosis hepática por intoxicación con  $CCl_4$  y una expresión del transgen por 10 días (43).

Como objetivo a mediano plazo en nuestro grupo, está la aplicación de las estrategias de medicina genómica Ad-huPA (exitosas en los modelos experimentales) en protocolos clínicos de cirrosis hepática por lo que es necesario evaluar la respuesta inmune despertada por el adenovector en esta patología en un estado de pre-inmunización y evaluar la inmunosupresión transitoria como una estrategia que nos permita una re-administración segura del adenovector en pacientes cirróticos pre-inmunizados, logrando con ésto una mayor persistencia en la expresión del transgen.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aplicación de las estrategias de medicina genómica que involucren adenovirus como vectores en protocolos clínicos de cirrosis hepática, deben considerar que la pre-inmunización contra los adenovirus es un estado común en los humanos, la memoria inmune repercutirá en la eficacia del tratamiento, ya que puede disminuir la transducción lograda con la administración. Por lo tanto, es necesario valorar el efecto de la inmunosupresión transitoria sobre la expresión del transgen en ratas cirróticas pre-inmunizadas como una herramienta que nos permita en un futuro aplicar esta estrategia en pacientes cirróticos pre-inmunizados.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La pre-inmunización contra los adenovirus es un estado común en los humanos. Esta memoria inmune influye en la eficiencia de transducción en terapia génica. El uso de inmunosupresores co-administrados con estos vectores incrementa la eficacia de la transferencia de genes. En la cirrosis hepática el empleo de adenovirus como vectores es muy prometedora. Se requiere evaluar la factibilidad de uso de un fármaco inmunosupresor en un modelo de esta patología y con un estado de sensibilización al adenovirus, como estrategia que incremente la expresión del transgen.

## **5. HIPÓTESIS**

La inmunosupresión transitoria con Ciclosporina incrementa la expresión de la proteína  $\Delta$ uPA en ratas cirróticas pre-inmunizadas al adenovirus mediante la disminución de la respuesta inmune.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de uPA en ratas cirróticas pre-inmunizadas al adenovirus e inmunosuprimidas con Ciclosporina.

### 6.2 Objetivos particulares

- Valorar el proceso inflamatorio en el hígado a través de cortes histológicos.
- Evaluar el efecto de la pre-inmunización e inmunosupresión transitoria en la actividad antifibrótica de uPA mediante análisis morfométrico.
- Valorar la influencia de la pre-inmunización y la inmunosupresión transitoria con ciclosporina sobre la expresión del gen terapéutico.

## 7. METODOLOGÍA

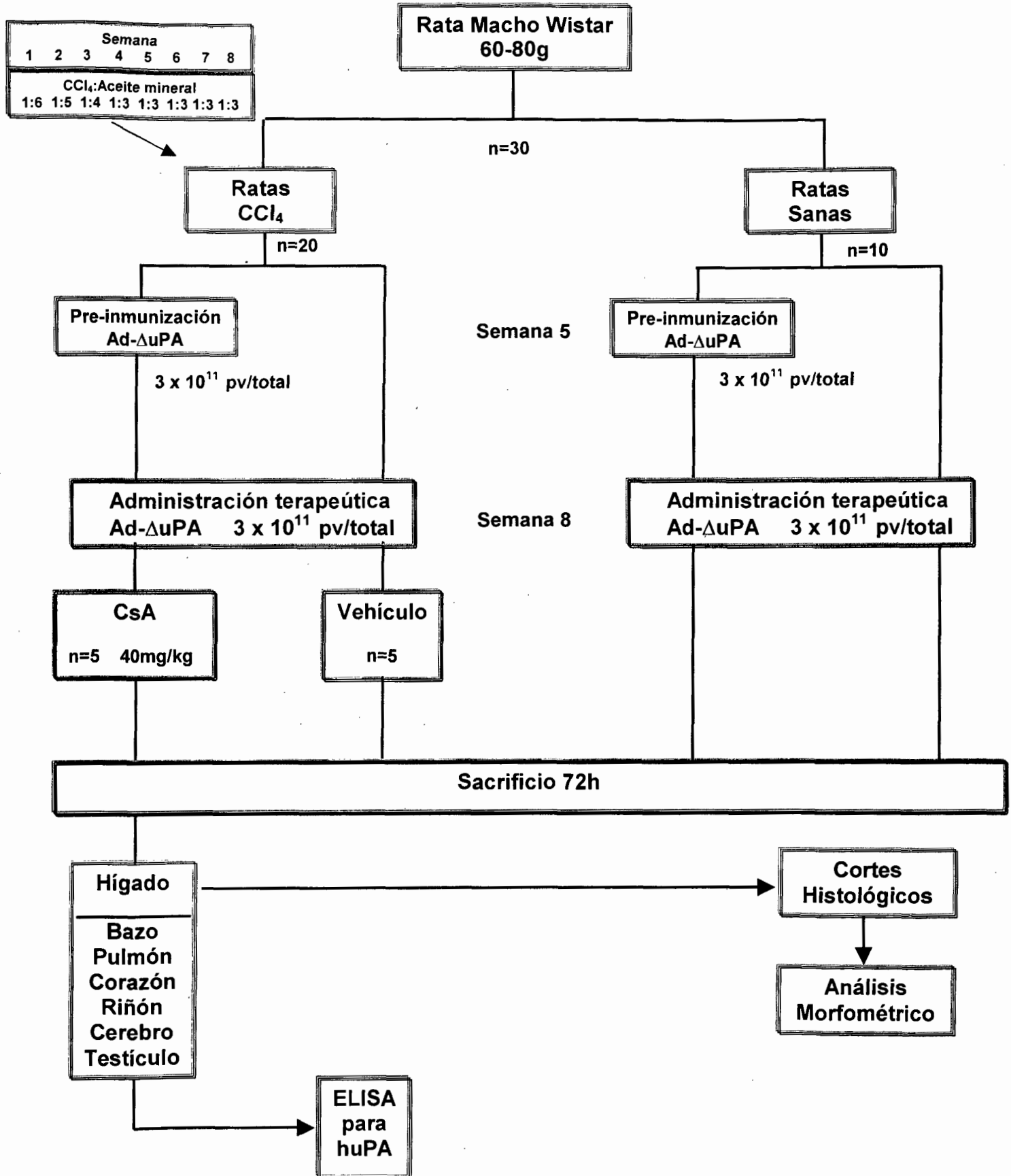
### 7.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

El estudio es de tipo experimental y prospectivo, en el cual los criterios de inclusión para los individuos son: Ratas de la cepa Wistar, machos con un peso de 60-80 g al inicio del régimen de intoxicación por CCl<sub>4</sub>. Dichos animales serán excluidos del estudio si llegan a desarrollar laberintitis (inflamación en el oído medio) o algún otra infección.

### 7.2 ESTADÍSTICA

El tamaño de la muestra se calculó según la fórmula de medias poblacionales, resultando en grupos de 5 animales para tener un poder estadístico del 80% y una significancia del 95%. El análisis de los datos obtenidos se realizará mediante la prueba de ANOVA multifactorial.

### 7.3 Diagrama de flujo





## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 8.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 60-80 g al inicio de la intoxicación con  $\text{CCl}_4$ , fueron mantenidas en condiciones estándares de manejo según los procedimientos del Bioterio del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

### 8.2 Grupos experimentales de ratas

Los grupos fueron divididos en grupos de ratas sanas, ratas sanas pre-inmunizadas, ratas cirróticas con y sin inmunosupresión, ratas cirróticas pre-inmunizadas con y sin inmunosupresión (Tabla 1).

<b>Sanas</b>	<b>Sanas Pre- inmunizadas</b>	<b>Cirróticas</b>	<b>Cirróticas CsA</b>	<b>Cirróticas Pre- inmunizadas</b>	<b>Cirróticas Pre- inmunizadas CsA</b>
<b>5 Ratas</b>	<b>5 Ratas</b>	<b>5 Ratas</b>	<b>5 Ratas</b>	<b>5 Ratas</b>	<b>5 Ratas</b>

Tabla 1. Esquema de los grupos de estudio

### 8.3 Modelo experimental de cirrosis hepática

La inducción del daño hepático se produce por una intoxicación crónica por 8 semanas con  $\text{CCl}_4$ . El régimen es de tres administraciones intraperitoneales por semana de 0.2 ml de una mezcla  $\text{CCl}_4$ :Aceite Mineral en concentraciones crecientes del hepatotóxico. La primer semana la relación es 1:6, la segunda 1:5, tercera 1:4 y a partir de la cuarta semana 1:3 (44).

#### **8.4 Generación de adenovirus recombinantes**

Se produjeron adenovirus recombinantes de primera generación deficientes en replicación (carecen de las regiones E1 y E3) conteniendo el transgen de  $\Delta$ uPA con el promotor de CMV y la señal de poliadenilación de SV40.

Las preparaciones en gran escala se producen creciendo los virus en células 293 (células embrionarias de riñón humano) transfectadas establemente con la región E1 viral en cajas de cultivo de 150 mm de diámetro a 37° C en una incubadora con atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células crecen en medio esencial mínimo (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS). Los Ad recombinantes fueron purificados por doble gradiente de CsCl (45). Las preparaciones virales fueron dializadas 3 ocasiones en solución amortiguadora para adenovirus (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM MgCl<sub>2</sub> y 4% sacarosa). Los adenovirus recombinantes fueron titulados en células 293 mediante diluciones de punto-final y almacenados a -80 °C (46).

#### **8.5 Administración del adenovector**

Se administró una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/total por vena ilíaca, diluyendo las partículas virales en 300  $\mu$ l de amortiguador [Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM y sacarosa al 4%, pH 8.0]. El procedimiento consiste en hacer una pequeña incisión en la cara interna del muslo y exponer la vena ilíaca, posteriormente se le administra el vector con una jeringa para insulina, terminando la administración se hace presión sobre la vena para evitar un sangrado, la herida es cerrada con seda 3 ceros y limpiada con isodine. Los animales fueron anestesiados con éter (47).

#### **8.6 Pre-inmunización de los animales**

La pre-inmunización se realizó por administración sistémica vía vena ilíaca con Ad- $\Delta$ uPA en una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/total; esto a la quinta semana de la administración del hepatotóxico y a la fecha correspondiente en los animales sanos. A la octava semana de intoxicación con CCl<sub>4</sub> se realizó la segunda administración en una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/total.

### **8.7 Inmunosupresión de los animales**

Los grupos de ratas cirróticas y cirróticas pre-inmunizadas fueron sub-divididos para la inmunosupresión la cual se realizó con 40 mg de ciclosporina por kg de peso diluida en etanol y administrado por vía intragástrica 24 horas antes, inmediatamente previo a la administración "terapéutica" del adenovector y 24 horas después de ésta. Ambos grupos contaron con sus controles a los cuales se les administró vehículo.

### **8.8 Sacrificio de animales**

El sacrificio de los grupos se realizó en una cámara de anestesia por inhalación de éter etílico a las 72 horas posteriores a la administración del vector adenoviral. Porciones representativas de hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, testículo y cerebro se colocaron en tubos eppendorf y se congelaron inmediatamente en acetona/CO<sub>2</sub> y se almacenaron a -70°C hasta su utilización. Así mismo, cortes de tejido hepático fueron fijados en paraformaldehído al 4% y procesados para realizar los cortes histológicos.

## **9. EXPRESIÓN DE huPA POR ELISA**

### **9.1 Preparación de homogenados**

De los diversos órganos corporales recolectados como hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón, testículos y cerebro se tomaron 150mg de tejido y se homogenizaron manualmente con 400 µl de buffer [Tris-HCl 0.05M, NaCl 0.15M, HEPES 0.01M, CaCl<sub>2</sub> 2mM, Tween 80 0.01%, Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1mM, pH 8.5 e Inhibidores de proteasas (Protease Cocktail 25X, Roche)]; el homogenado se centrifugó a 12,000 rpm por 15' a 4°C, alícuotas del sobrenadante fueron almacenadas a -70°C. Para asegurar su estabilidad las proteínas solo fueron descongeladas una sola vez.

## 9.2 Determinación de la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford

La técnica de Bradford nos permite conocer la concentración de proteínas totales en una muestra. Se realiza una curva con concentraciones conocidas de albúmina en solución amortiguadora de fosfatos (PBS *phosphate buffer solution*) la cual permite interpolar los valores de las muestras. La curva y las muestras se procesan por duplicado; se diluyen en PBS (generalmente 1:50). Se adicionan 1.5 ml del reactivo de Bradford a 50  $\mu$ l de la curva o de la muestra, se mezclan. El color café del reactivo de Bradford se torna azul al contacto con las proteínas. La concentración de la proteína es proporcional a la coloración azul desarrollada y se determina mediante espectrofotometría a 595 nm. La concentración de la muestra se calcula por interpolación con la curva mediante regresión lineal simple.

## 9.3 ELISA para uPA

Se determinaron los niveles de huPA por ELISA utilizando el kit comercial de la marca Oncogene Science, esta técnica consiste en un inmunoensayo enzimático tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el uPA humano, como los reactivos de captura. La sensibilidad del ensayo va de 0-350 pg/ml. Para realizar el ensayo, se adicionan 100  $\mu$ l del estandar o de la muestra (20-50  $\mu$ g de proteína total) a cada pozo y se incuba para permitir la unión del Ag con el anticuerpo de captura (de cabra). El Ag inmovilizado reacciona con el Ac detector de uPA producido en conejo. La cantidad del Ac detector unido al Ag es medido a través de la unión de este con el conjugado de peroxidasa (HRP, *Ig-G horseradish peroxidase*) producido en cabra contra el de conejo. El revelado del complejo se hace por la reacción colorimétrica entre la HRP y el sustrato OPD (*o-fenilendiamina*) que desarrolla un color amarillo. Las placas fueron leídas a 490nm, en un lector de placas de ELISA. Los resultados se cuantifican gracias a la interpolación en una curva proporcionada por el proveedor mediante regresión lineal simple.

## **10. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

En cortes de tejidos teñidos con tricrómico de Masson y rojo sirio se evaluó el porcentaje de fibrosis en 10-15 campos de hígado afectado, mediante un programa de captura y análisis de imágenes computarizado (Image Pro Plus). El análisis consiste en la selección por coloración del área total del tejido hepático y el área con fibrosis; los cuales representan el 100% y sobre este total se calcula el porcentaje de tejido fibroso. Es un método automatizado que procesa imágenes objetivas, confiables y reproducibles, y actualmente es uno de los estándares para la cuantificación de fibrosis hepática.

### **10.1 Procesamiento histológico de tejidos**

Los cortes de tejido hepático se fijan con paraformaldehído al 4% por 24 horas. La deshidratación y aclaración del tejido incluye dos baños con PB (solución amortiguadora de fosfatos) durante 15 min, deshidratación con baños de alcohol al 50%, 60%, 70% (toda la noche), 80%, 96% (2 cambios), y 100 % durante 1 hora. La aclaración del tejido se logra con un baño de alcohol/xilol durante 2 horas y con xilol (2 cambios) por 1 hora. El tejido procesado se pasa entonces a la parafina líquida a 56° C durante 30 min, y luego 3 veces más durante 1 hora. Finalmente son embebidos con parafina y montados en moldes de metal (Leica). Los tejidos fueron cortados en fragmentos de 5 micras de grosor y capturados en un baño de agua a 45°C en laminillas gelatinizadas para su posterior tinción.

### **10.2 Tinción tricrómica de Masson**

Con la tinción tricrómica de Masson podemos apreciar la matriz extracelular, que se tiñe por colorantes ácidos (azul de anilina), mientras los núcleos se tiñen de negro y el músculo, citoplasma y queratina de rosa. La técnica consiste en deshidratar los cortes en 2 baños de xilol por 5 min y después en alcohol al 100% por 5 min (2 veces), al 95%, 90% , 80% y agua por 3 min, Las laminillas pasan al líquido de Bouin por 1hr en el horno a 56°C, se dejan enfriar durante 10 min y se lavan con agua corriente hasta que las secciones se aclaren. Posteriormente se

colorea con la solución madre de hematoxilina férrica de Weigert (preparada recientemente) durante 10 min y se lavan con agua corriente por 10 min. Se añade la solución de fuschina ácida-escarlata de Briebrich durante 8 min y se enjuagan con agua destilada. Se colocan en solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 15 min y para finalizar, se adiciona el azul de anilina por 15 min. Las laminillas se colocan en ácido acético al 1% durante 4 min para diferenciar. Los cortes se vuelven a deshidratar en baños de alcohol al 80%, 95 % (2 veces), 100% (2 veces) hasta llegar a xilol (2 veces) y se montan con resina.

### **10.3 Tinción de rojo sirio**

Esta tinción nos permite visualizar colágenas depositadas, las cuales se tiñen por el colorante ácido rojo sirio; se hace una contra-tinción con verde escarlata que permite diferenciar el resto del parénquima. La tinción consiste en deshidratar los cortes en 2 baños de xilol por 10 min y en alcohol al 100%, al 70%, al 50% y agua durante 4 min. Posteriormente, se tiñen con la mezcla de rojo sirio/verde escarlata durante 90 min, se lavan hasta eliminar el exceso del colorante y se montan en seco.

## **11. INFLAMACIÓN Y DAÑO TISULAR POR LA ADMINISTRACIÓN DEL AD**

### **11.1 Tinción hematoxilina-eosina**

Esta tinción se realiza para visualizar inflamación y alteración de la arquitectura hepática. Cortes histológicos de hígado se deshidratan en 2 baños de xilol por 2 y se pasan al alcohol 100% (2 veces), 96% (2 veces) por 2 min. Después se tiñen con hematoxilina de Harris (filtrada y activada) por 2 min y se lavan con agua corriente. Posteriormente se pasa a un baño con agua amoniacal hasta que las secciones se vean de un color azul brillante (1 min), contrastar con solución eosina/floxina por 2 min y lavar con agua corriente. Una vez teñidos los tejidos se deshidratan 2 veces con alcohol al 96%, 100% y xilol por 2 min. El montaje se hace con resina. El citoplasma de las células hepáticas se tiñe de rosa y de color azul se tiñen los núcleos de neutrófilos y células mononucleares.

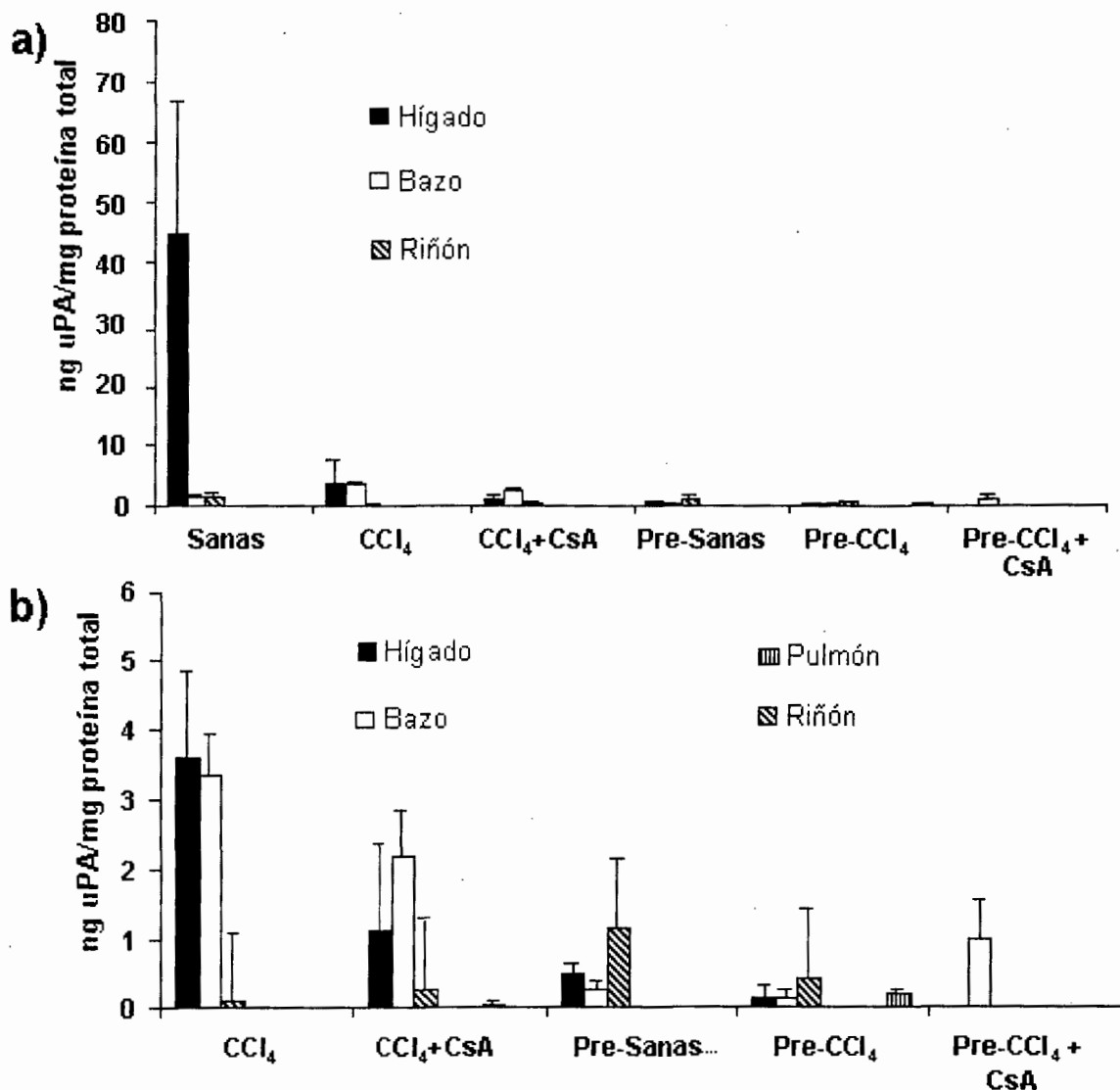
## 12. RESULTADOS

### 12.1 Expresión del transgen uPA por ELISA

La evaluación de la expresión proteica se determinó en homogenados de tejido a las 72 horas post-administración, mediante la técnica de ELISA. La proteína sólo fue detectada en hígado, bazo y riñón. Los animales no pre-expuestos al Ad, mostraron una expresión marcadamente mayor en el tejido hepático que sus contrapartes preinmunizados. La proteína también fue detectada en bazo en estos grupos. Sin embargo, la administración del inmunosupresor en el grupo cirrótico pre-inmunizado invirtió el patrón al predominar la expresión de la proteína en el bazo.

Los hígados de animales sanos, expresaron en promedio 10 veces más proteína (45 ng/mg) que el mismo tejido en animales cirróticos (Figura 9a).

Los animales sanos y cirróticos pre-inmunizados mostrarán una expresión menor (50-150 pg/mg) que sus grupos controles y es el riñón el órgano con mayores niveles de la proteína en estos grupos. El grupo cirrótico sensibilizado y tratado con CsA expresó la proteína preferentemente en bazo (Figura 9b).



**Figura 9. Expresión de la proteína huPA a las 72 horas.**

**a)** La cantidad de proteína detectada en hígado de animales sanos es de 45 ng de huPA /mg de proteína total, cantidad significativamente mayor ( $P > 0.01$ ) que en el resto de los órganos en cualquiera de los grupos. Los animales sanos previamente expuestos al vector no alcanzan estos niveles de la proteína terapéutica, indicando un claro bloqueo en la expresión del transgen como efecto de la preinmunización, mismo que no logra ser rebatido por la inmunosupresión transitoria.

**b)** Expresión de huPA excluyendo el dato de hígado sano. La proteína terapéutica es detectada exclusivamente en hígado, bazo y riñón en todos los grupos. Los animales cirróticos expresan cantidades menores del transgen respecto a los animales sanos. La preinmunización al Ad-hΔuPA disminuye significativamente la expresión de la proteína tanto en los animales cirróticos, como en los sanos. La administración de ciclosporina no incrementa la expresión en ninguno de los grupos.



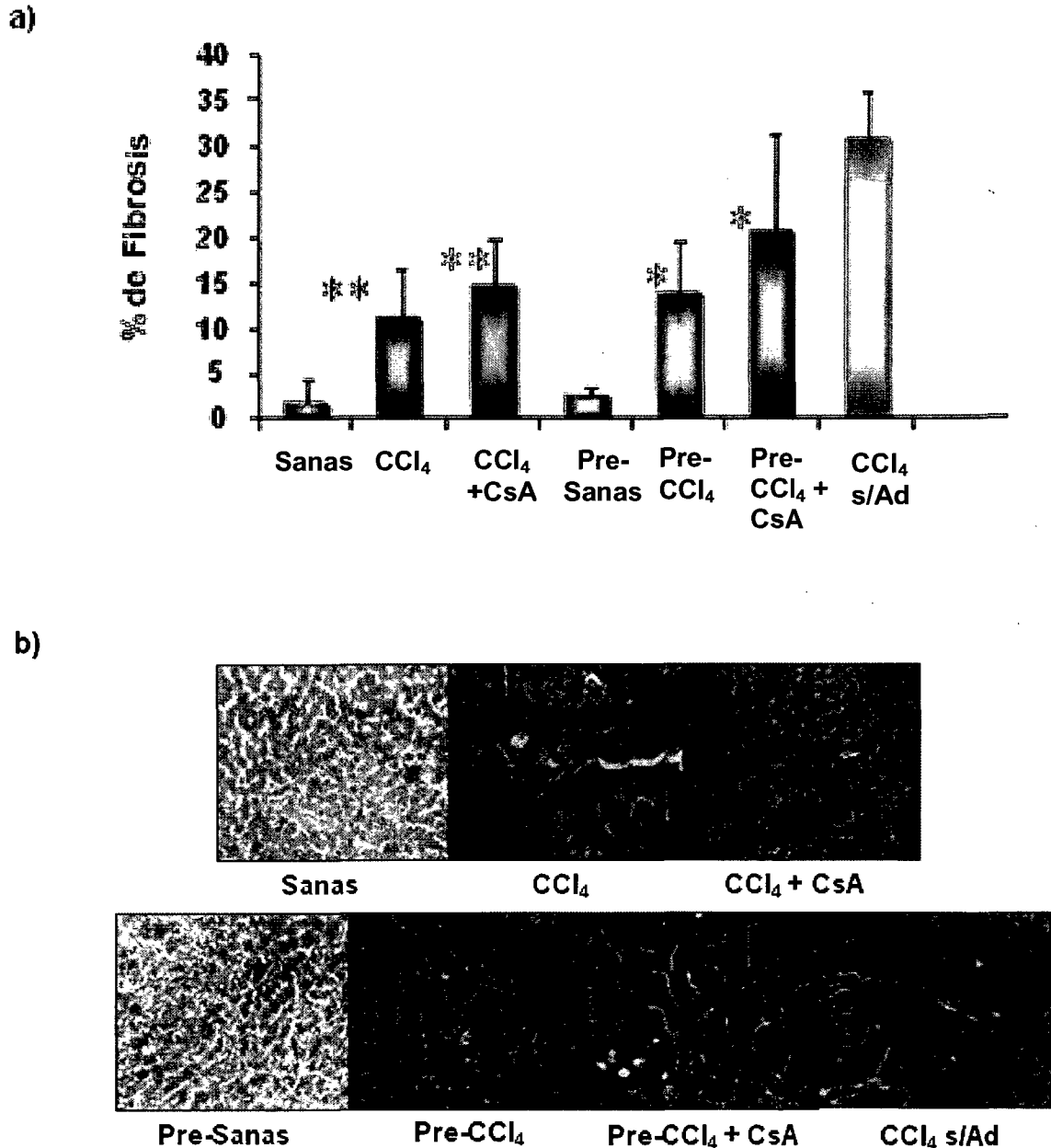
## 12.2 Análisis morfométrico

Los animales cirróticos presentaron alteraciones tisulares típicas de un proceso fibrótico; nódulos de regeneración rodeados por gruesas bandas de septos fibróticos; en contraste con el grupo tratado con Ad-hΔuPA que presenta una reducción significativa en la fibrosis de 22 al 50% respecto al grupo control. Este grupo muestra una notable reducción de los septos fibróticos y una resolución de la fibrosis periportal y centrolobular comparada con la fibrosis progresiva de los controles sin gen terapéutico (Figura 10).

Se observó cómo la administración del adenovirus produce una minúscula lesión hepática aún en las ratas sanas. La administración de uPA logra una reversión notable respecto a las ratas cirróticas sin tratamiento, aún con solo 72 horas de expresión de la proteína terapéutica.

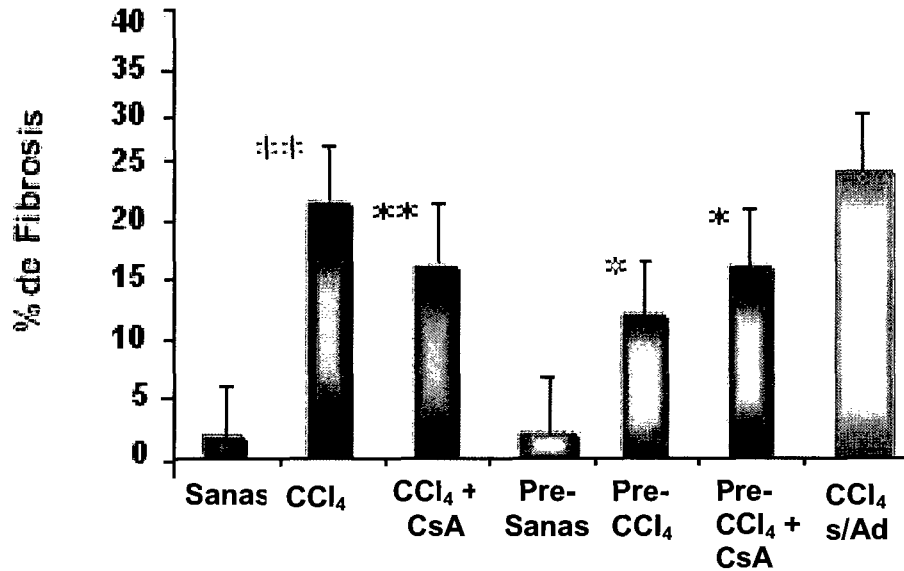
La reversión de la fibrosis, se vio afectada ligeramente por la preinmunización y la inmunosupresión, ya que los grupos sensibilizados y/o inmunosuprimidos muestran a los 3 días posteriores a la administración de Ad-hΔuPA una mayor cantidad de tejido fibrótico respecto a sus grupos controles, según el análisis morfométrico en las tinciones de Masson.

En el análisis con la tinción de rojo sirio muestra diferencias no significativas entre los grupos preinmunizados y vírgenes, aunque la tendencia a la disminución de la fibrosis es inversa a la encontrada con la tinción de Masson entre estos grupos (Figura 11).

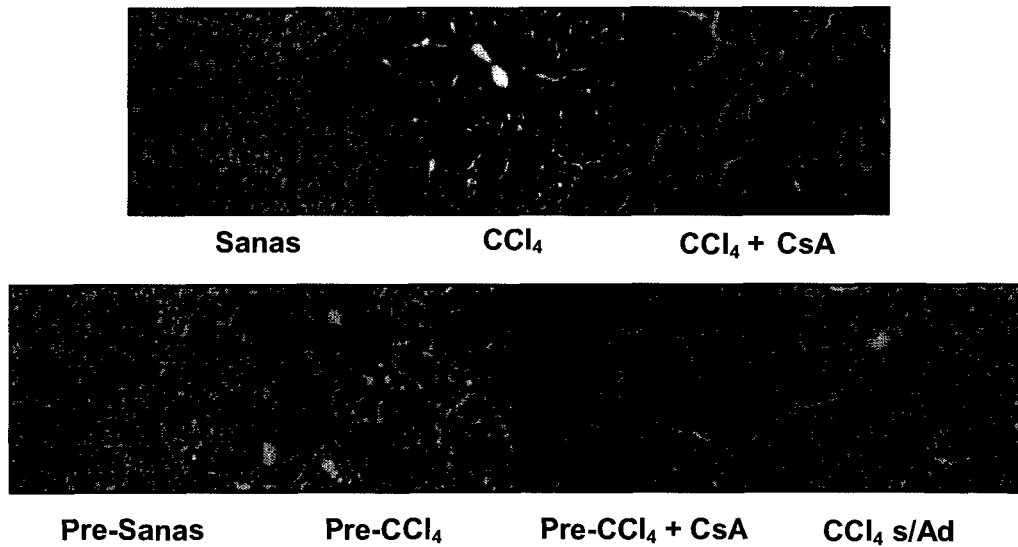


**Figura 10. Análisis Morfométrico.** Tinción tricrómica de Masson (40X). **a)** El efecto de la expresión del gen terapéutico a las 72 horas es notorio en los animales cirróticos vírgenes (\*\* $P > 0.005$ ) y aún en los animales preinmunizados (\* $P > 0.05$ ). **b)** Imágenes representativas de la reversión de la fibrosis en los animales cirróticos. En las ratas cirróticas no pre-expuestas fue de un 50% y de un 22% en los animales cirróticos preinmunizados.

a)



b)

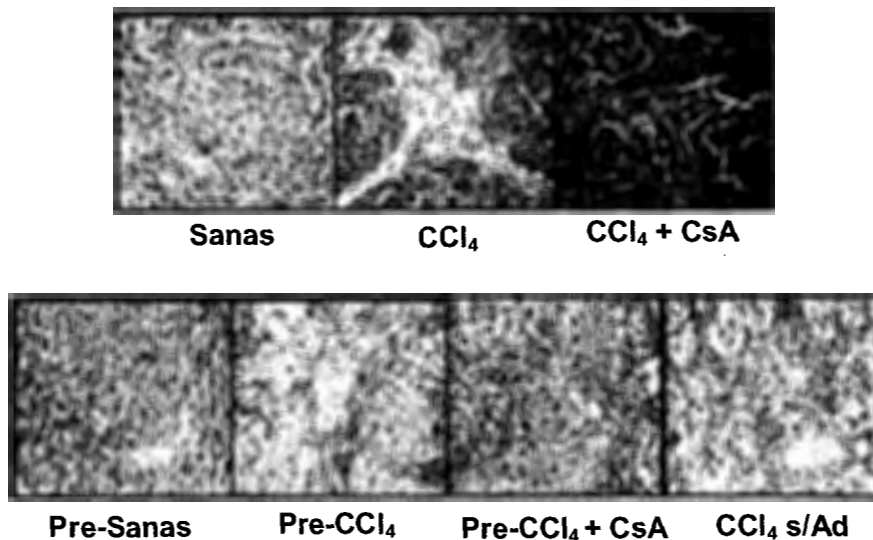


**Figura 11. Análisis Morfométrico.** Tinción de rojo sirio (40X). **a)** El patrón de reversión de la fibrosis no presenta diferencias significativas entre los grupos pre-inmunosuprimidos y no sensibilizados. El efecto en la reducción de la fibrosis por la expresión del gen terapéutico a las 72 horas se observó en los animales cirróticos vírgenes (\*\* $P > 0.01$ ) y aún en los animales preinmunizados (\* $P > 0.005$ ). **b)** Imágenes representativas de la tinción de rojo sirio, se aprecia la reversión significativa de la fibrosis en los animales cirróticos preinmunizados.

### 12.3 Inflamación y daño tisular por la administración del Ad

El grupo cirrótico sensibilizado al Ad muestra una severa reacción inflamatoria y abundante infiltrado de células inmunes, con la segunda administración del Ad. Las células hepáticas lucen irregulares, la estructura del tejido se pierde totalmente. La inmunosupresión transitoria con CsA en este grupo cirrótico preinmunizado disminuye ligeramente el infiltrado inflamatorio, pero las alteraciones arquitectónicas del tejido persisten.

Los animales sanos no presentan una reacción inflamatoria por la administración del Ad; y aun sensibilizados esta reacción no llega a ser notable. Evidentemente, la pre-exposición al Ad tiene efectos diferentes en los animales sanos que en los cirróticos; parecería que el daño hepático ocasionado por la cirrosis aunado a una sensibilización al adenovector, induce con la administración terapéutica del Ad-hΔuPA un severo daño tisular al hígado, que se refleja en pérdida de la arquitectura y abundante infiltrado inflamatorio; que ni aún mediante una inmunosupresión transitoria logra disminuir significativamente (Figura 12).



**Figura 12. Tinción de hematoxilina-eosina. (40X)** La evaluación de la arquitectura hepática y el infiltrado inflamatorio se realizó en por lo menos 10 campos. El tejido hepático de animales cirróticos sensibilizados se presenta con un infiltrado inflamatorio significativo, mientras los grupos vírgenes presentan daño arquitectónico, pero con un nivel de inflamación menor. El tratamiento temporal con ciclosporina disminuye ligeramente la inflamación. Los animales sanos pre-expuestos no muestran un infiltrado o daño tisular significativo respecto a su grupo control.

### 13. CONCLUSIONES

- Los grupos pre-inmunizados muestran una severa reacción inflamatoria y abundante infiltrado.
- La inmunosupresión transitoria con ciclosporina disminuye el proceso inflamatorio ocasionado por la pre-inmunización.
- La reversión de la fibrosis que se logra en los grupos cirróticos tratados es significativa ( $p > 0.05$ ) respecto a las ratas cirróticas sin tratamiento, a tan solo 72 horas de expresión de la proteína terapéutica.
- La reducción de la fibrosis fue de un 50% en los animales cirróticos y de un 22% en el grupo cirrótico pre-inmunizado.
- La reversión de la fibrosis se vio afectada por la pre-inmunización y la inmunosupresión transitoria, ya que los grupos sensibilizados y/o inmunosuprimidos muestran ligramente más cantidad de tejido fibrótico en la tinción de Masson.
- El valor máximo de proteína fue detectada en el hígado del grupo de animales sanos en una concentración de 45ng/mg.
- La expresión de uPA fue 10 veces más en el hígado de animales sanos que en el mismo órgano en los animales cirróticos.
- La pre-inmunización disminuye la expresión de la proteína hasta (50-150 pg/mg).
- La proteína fue detectada exclusivamente en hígado, bazo y riñón en todos los grupos.
- La inmunosupresión transitoria con ciclosporina no incrementa la expresión de h $\Delta$ uPA en ninguno de los grupos.

## 14. DISCUSIÓN

El hígado es el principal órgano transducido por adenovirus cuando son administrados por vía sistémica (47).

En nuestro estudio la proteína fue detectada a las 72 horas post-administración mediante una prueba ELISA en homogenados de tejido, exclusivamente en hígado, bazo y riñón, en todos nuestros grupos. Los niveles de expresión de la proteína fueron de 45 ng de uPA/ mg de proteína total en hígados de animales sanos, mientras los animales cirróticos y cirróticos tratados con ciclosporina la expresaron en cantidades 10 veces menores; niveles similares fueron detectados en bazo. La expresión de uPA en los grupos pre-inmunizados disminuye a cantidades de 50-150 picogramos. La administración del inmunosupresor no logra aumentar la expresión de la proteína en los animales cirróticos pre-inmunizados ni aún en los animales cirróticos ó sanos pre-inmunizados.

La cantidad de proteína detectada en los hígados cirróticos no sufrió variaciones por el uso del inmunosupresor, pero si una notable disminución cuando fueron pre-expuestos al adenovirus, hecho que se presentó también en los animales sanos.

La preinmunización por tanto disminuyó la cantidad de proteína detectada pero no cambió el patrón de órganos que la expresan, mientras la inmunosupresión transitoria con ciclosporina parece no mejorar la expresión hepática en ninguno de los grupos (cirróticos y pre-inmunizados).

De la población celular del hígado que logra ser alcanzada por el adenovector la gran mayoría son hepatocitos (40-75%) aunque también los macrófagos tisulares y el epitelio biliar presenta inmunoreactividad a la detección de la proteína transgénica. Trabajos previos de nuestro equipo demostraron el efecto antifibrótico de hΔuPA, mismo que fue confirmado en nuestro estudio por un análisis morfométrico en cortes histológicos teñidos con Masson. Los animales cirróticos presentaron el mayor porcentaje de reversión en la fibrosis (22-50%), en el resto de los grupos la mejoría fue menor pero significativa ( $p > 0.05$ ) respecto a los animales sin tratamiento (49).

Los animales cirróticos inmunosuprimidos muestran un grado de fibrosis ligeramente mayor que su control lo que sugiere que la ciclosporina pudiera tener un efecto aparentemente negativo sobre la arquitectura hepática y/o en el efecto del transgen debido a su metabolismo en este órgano.

Existe un efecto deletéreo por la pre-inmunización sobre la actividad antifibrótica del transgen, ya que estos animales presentan un porcentaje de fibrosis ligeramente mayor que el grupo no sensibilizado. La administración del inmunosupresor no se traduce en un efecto protector en los tejidos, ya que un la administración con CsA deja al tejido cirrótico expuesto a la transducción, debido al bloqueo temporal de la respuesta inmune (menos formación de complejos antígeno-anticuerpo), como se sabe el adenovirus ocasiona un daño tisular al introducirse a las células (48).

El patrón de reversión con rojo sirio fue similar a la tinción de Masson, sólo que en el grupo de ratas cirróticas inmunosuprimidas hubo una mayor reversión que en el grupo cirrótico sin inmunosupresión, lo que hace los resultados no concluyentes respecto al efecto de CsA.

El papel de uPA en la regeneración celular hepática se fundamenta en la activación directa que hace del HGF, ya que existe un alto grado de homología estructural entre las moléculas de HGF y su sustrato el plasminógeno, en la cercanía del sitio de rompimiento proteolítico de pro-HGF (50).

Además, los eventos inducidos por la sobreexpresión de uPA, conducen a una cascada de activación de metaloproteasas que como se sabe, son las proteasas encargadas de la remodelación y la degradación *in situ* del exceso de matriz extracelular acumulada durante la fibrosis en el espacio de Disse, lo que puede resultar además en la liberación de HGF de su depósito en MEC. Sin embargo, en la fibrosis no solo la disminución en la degradación del exceso de matriz conlleva al acúmulo de ésta, sino también la sobreproducción de colágenas de tipo fibrilar, principalmente tipo I, III y IV (41).

El daño celular ocasionado por la memoria inmune de los animales sensibilizados es debido a la respuesta citotóxica que se despierta contra los hepatocitos transducidos, por parte de los linfocitos T, que logran lisis la célula hepática liberando su contenido. El hecho de que con la ciclosporina exista un daño menor, habla de la ventaja que confiere esta estrategia, limitando la inflamación y citotoxicidad al tejido hepático, de por sí dañado por la fibrosis.

La respuesta inmune innata contra los adenovirus incluye la activación del complemento a través de la vía clásica (reacción antígeno-anticuerpo) y de la alternativa (51) aún en ausencia de anticuerpos anti-Ad5, esta activación contribuye a una respuesta inflamatoria sistémica, e inclusive podría inducir a un shock anafiláctico o síndrome de desorden respiratorio del adulto, o falla orgánica múltiple. La activación del complemento se ve afectada por la vía de administración, la dosis, la presencia de anticuerpos pre-existentes y de proteínas reguladoras, y aun el cambio de serotipo del adenovirus en una segunda administración, no asegura la disminución de la respuesta pues existe una "reacción cruzada" (52). Especialmente, dosis altas administradas por rutas sistémicas, inducen una elevada activación del complemento (se considera que administraciones locales a dosis bajas, no tendrían el riesgo de inducir una activación sistémica del complemento), nuestra dosis del rango de  $10^{11}$ pv se considera una dosis alta, lo que explicaría el aumento en los niveles de inflamación y citotoxicidad en los animales previamente inmunizados.

Además, existen reportes de activación directa de NF $\kappa$ B por el adenovirus, que conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10; provenientes de macrófagos y células dendríticas (51). Todo esto contribuye a perpetuar la respuesta inflamatoria y a reclutar células inflamatorias adicionales. Los parámetros relacionados con la inflamación fueron evaluados en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, en éstos se observa una disminución del infiltrado inflamatorio en los grupos de animales tratados con el inmunosupresor.



Sin embargo, la arquitectura del tejido se ve dañada considerablemente en los animales preinmunizados aún cuando hayan sido inmunosuprimidos transitoriamente, así que la pre-inmunización no elimina la toxicidad inducida por el vector. Ésto creemos puede ser ocasionado por el hecho de que en este grupo la transducción se espera sea mayor debido a la disminución de los anticuerpos circulantes contra el adenovirus, lo que favorece una disminución en la formación de complejos antígeno-anticuerpo; dejando libre al adenovirus para internalizarse en las células blanco. Ésto sugiere que la ciclosporina logra abatir la respuesta inmune al grado de que el Ad es captado por las APCs; más no es eliminado por las células citotóxicas; cosa que no sucede en los grupos preinmunizados. Varnavski *et al*, reporta una toxicidad sistémica inducida por el vector la cual no es eliminada por la pre-inmunización; los niveles séricos de IL-6 aumentan significativamente con la administración del vector, pero en mayor medida en monos preinmunizados (lo mismo sucede en ratones con IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ ); la inmunidad pre-existente induce efectos inhibitorios específicos contra el vector que disminuyen sustancialmente la expresión del transgen; pero tienen un efecto mínimo en la transducción. Este daño es resultado de la transducción del adenovirus en el parénquima hepático, la cual se espera sea mayor en los animales inmunosuprimidos. La presencia de anticuerpos anti Ad5 lleva a la formación de complejos Ag-Ac los cuales impiden la transducción, fenómeno que no sucederá en igual magnitud en los animales inmunosuprimidos que tendrán una cantidad menor de anticuerpos debido al efecto de la ciclosporina. Ésto entonces favorece la transducción, pero es por ello que el daño arquitectónico al tejido hepático persiste, pues la entrada del adenovirus a la célula conlleva cierto daño tisular transitorio.

Consideramos que estos estudios abren una perspectiva al uso de la terapia génica en el ámbito clínico, se deben considerar los aspectos inmunes debido a que el adenovirus es agente infeccioso del humano. Sin embargo, la estrategia de una inmunosupresión transitoria debe ser mejorada para que se obtengan beneficios sustanciales en la expresión de la proteína terapéutica, sin repercusiones críticas en el sistema inmune del paciente.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. (38):38-53.2003.
2. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). Revisado 14 de octubre del 2005.
3. West JB, Best T. *Biología molecular en gastroenterología y hepatología*. (1991). Bases Fisiológicas de la Práctica Médica 12° Ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pag.488-492.1991.
4. Maher JJ. Alcoholic liver disease. In Feldma M, Scharchmidt BF. (eds), *Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology Diagnosis Management*. Philadelphia, Penn.1998.
5. Weatherall DJ, Bunch C. La sangre y los órganos hematopoyéticos. Smith/Thies. *Fisiopatología (Principios biológicos de la enfermedad)* Vol 12. San francisco, California. Editorial Panamericana. Pag 290-291.1998.
6. Friedman SL. The cellular basic of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *New Engl J Med*.328(25):1828-1835.1993.
7. Guyton AC, Hall JE. *El Hígado como órgano. Tratado de Fisiología Médica*. 10ª Ed. Editorial Mc Graw Hill. México. 2001.
8. Robert K, Murroy P, Mayes A, Gramer DK, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. 12°Ed. El Manual Moderno. México, DF. Pag 634-635.1992.
9. Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrosis. *J. Gastro and Hepatol* (15):33-36.2001.
10. García-Benavides L. Reversión de la cirrosis hepática experimental con el empleo de una nueva droga anti-fibrótica; piferidone. Tesis de Doctorado en Farmacología. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. 2002.
11. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *The Clinical Electron Microscopy Society*. (37):3-15.2004.
12. Mitsuru S. Shinsuke S., Haruki S. Hepatic stellate cell: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and Function*.(28):105-112.2003.

13. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*.275:2247-2250.2000.
14. Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry*.(67):92-98.2002.
15. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Molecular Cell Biology*.(3):207-214.2002.
16. Massova, I., Kotra, L.P., Friedman, R., Mobashery, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*.(12):1075-1095.1998.
17. Souza AP, Peres- Line SR. The biology of matrix metalloproteinases. *FOB*.(10):1-6.2002.
18. Michael PH. Fibrogenesis: II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279:245-249.2000.
19. Currier AR, Sabla G, Locaputo S, Melin-Aldana H, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *AMJ Physiol Gastrointest Liver Physiol*.284: 508-515.2003.
20. Andreasen PA, Egelund R, Petersen H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *CMLS. Cellular and Molecular Life Sciences*. Pag 25-40.2000.
21. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of combinant membrane type-1 matrixmetalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*.393:101-104.1996.
22. Stepanova V.V., Thachuk V.A. Urokinase as a Multidomain Protein and Polyfunctional Cell Regulator. *Biochemistry (Moscow)*. (1):109-118.2002.
23. Lieber A, Gown A, Perkins J, Kay MA. A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. *Hum Gene Ther* 6:1029-1037.1995.
24. Scarpelli D.G, Chiga M. Cell injury and errors of metabolism. In "Anderson's pathology". Edited by Kissane J.M. 8a Ed. 1985.
25. Recknagel O.R, Glende A.E, Dolak A.J, Waller L.R. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology Ther*.(1):139-154.1989.

26. Armendáriz-Borunda J, Katai h, Jones CM, Seyes JM, Kang JM, Ragliow R. Transforming growth factor  $\beta$ . is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration following CCl<sub>4</sub> treatment. Lab Invest. Pag 22:43-48.1993.
27. Cotran R.M, Kumar V, Collins T. Patología celular I: Lesión y muerte celular. In: Patología Estructural y Funcional. 6<sup>a</sup> Ed. Edit Mc Graw Hill Interamericana. Philadelphia Penn USA. 2000.
28. Perez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCL<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis?. Hepatology.(3):112-120.1983.
29. Kay MA, Glorioso JG, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med.7(1):33-40.2001.
30. Hilleman MR, Werner JR. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. Proceedings of a Society for Experimental Biology and Medicine.(85):183-188. 1954.
31. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. Curr Opin Biotechnol.(10):440-447.1999.
32. Bessis N, García-Cozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. Gene therapy.(11):10-17.2004.
33. García Bañuelos J, Salgado S, Hernández I, Armendáriz Borunda J. Adenovirus: ¿Son vectores adecuados para terapia génica?. Medicina Universitaria.(5):18-24.1999.
34. Castro MG. Gene therapy strategies for the treatment of pituitary tumors. Journal of Molecular endocrinology.(22):9-18.1999.
35. Douglas JT, Curiel DT. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine. Pag 44-53. 1997.
36. Jiang H, Serra WD, Frank MM, Amalfitano A. Recombinat adenovirus vectors activate the alternative complement pathway, leading to the binding of human complement protein C3 independent of anti-Ad antibodies. Molecular Therapy.(10):1140-1142.2004.
37. Chen D, Murphy B, Sung R, Bromberg JS. Adaptative and innate immune responses to gene transfer vector: Role of cytokines and chemokines in vector function. Gene Therapy. (10):991-998.2003.

38. Joos K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: Implications for gene therapy. *Gene Therapy*. (10):955-963.2003.
39. ILan Y, Sauter B, Roy-Chowdhury N, Bhoompally V.N. Oral tolerization to adenoviral proteins permits repeated adenovirus-mediated gene therapy in rats with pre-existing immunity to adenovirus. *J Clin Invest*(27):1368-1376.1998.
40. George J.A. Gene therapy progress and prospects: Adenoviral vectors. *Gene Therapy*.(10):1135-1141.2003.
41. Allison AC. Immunosuppressive drugs: The first 50 year and a glance forward. *Immunopharmacology*. 2000.479:63-83.
42. Stepkowski S.M. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Review in Molecular Medicine*.2000.
43. Salgado S, García J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura G, Orozco H, Hernández Pando R, Fafutis M, Aguilar L, Aguilar-Córdova E, Armendáriz-Borunda J. Liver Cirrhosis Is Reverted by Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene Therapy. *Molecular Therapy* (2)545-551.2000.
44. Armendáriz-Borunda J, Seyes JM, Kang AH, Raghov R. Regulation of TGF gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. *FASEB J*.4:215-221.1990.
45. Anderson R.D, Haskell R.E, Xia H, Roessler B.J, Davidson B.L. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Therapy*. (7):1034-1038.2000.
46. Nyberg-Hoffman C, et al., Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med*.(7):808-11.1997.
47. García-Bañuelos J, et al. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther*.(2):127-34.2002.
48. Varnavski AN, et al. Preexisting immunity to adenovirus in rhesus monkeys fails to prevent vector-induced toxicity. *J Virology*. (11):5711-9.2002.
49. Sun Z, et al. Amino-terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator inhibits its plasminogen activation. *Thromb Res*. (2):105-11.2002.
50. Ulloa BC. Efecto de uPA y delta-uPA sobre la regeneración celular en un modelo de cirrosis hepática experimental. Tesis de Licenciatura. CUCEI. Universidad de Guadalajara. 2005.

51. Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Therapy*.(11):935-40.2003.
52. Smith CA, et al. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum Gene Therapy*. (10):1419-27.1998.