



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE LA SEGURIDAD Y
DISTRIBUCIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA
LA TERAPIA GÉNICA EN PERROS CON
LINFOSARCOMA ESPONTÁNEO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

LUIS NÚÑEZ OCHOA

TUTOR:

VICENTE MADRID MARINA

COMITÉ TUTORAL:

**ANDRÉS GUTIÉRREZ LÓPEZ
FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA**

México DF.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICADO

**A MIS PADRES CARMEN Y EULALIO
POR SU AMOR Y EJEMPLO COTIDIANO**

**A MI ESPOSA ANAY MIS HIJOS NATALIA Y DANIEL
POR SU AMOR Y COMPRENSIÓN**

**A QUIENES SUFREN DE CÁNCER
Y ESPERAN UNA TERAPIA CURATIVA**

**AL INVESTIGADOR DESCONOCIDO
POR SER EL ARTÍFICE DE LOS AVANCES EN LA CIENCIA**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de doctorado en su programa de formación de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo obtenido mediante una beca de estudios para el doctorado.

Al Dr. Vicente Madrid Marina Director de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) como director principal del trabajo.

Al Dr. Andrés Gutiérrez Jefe de la Unidad de Terapia Celular del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) por su constante apoyo y dirección en el trabajo. Lugar en donde se desarrolló la preparación de los virus y la evaluación del material objeto de esta tesis.

Al Dr. Francisco Trigo Tavera Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por su atinada participación.

Al Jurado por sus comentarios que enriquecieron el trabajo.

Al Dr. Jan Bouda ejemplo en profesionalismo, conocimientos, responsabilidad, desinterés por ayudar y por su generosidad en compartir sus conocimientos y con quien es muy agradable trabajar. Toda mi admiración.

Un especial agradecimiento al MVZ EPCV Agustín Montes de Oca Acosta Director del Laboratorio Veterinario Experto y a la MVZ EPCV M^a Eugenia Martínez García Jefa de Servicio del Laboratorio Veterinario Experto por su disponibilidad constante, apoyo y por la beca recibida para la realización de los análisis hematológicos, bioquímicos, citológicos y de urianálisis.

A todos aquellos que de alguna manera de cerca o lejos contribuyeron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE CUADROS	II
LISTA DE FIGURAS	III
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN	2
3. ABSTRACT	3
4. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
4.1 TERAPIA GÉNICA	4
4.2 TERAPIA DEL LINFOSARCOMA	38
5. JUSTIFICACIÓN	41
6. HIPÓTESIS	42
7. OBJETIVO GENERAL	43
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
8. MATERIALES Y MÉTODOS	45
9. RESULTADOS	60
10. DISCUSIÓN	68
11. CONCLUSIONES	71
12. REFERENCIAS	72
13. ARTÍCULO DISTRIBUCIÓN DE β -GALACTOSIDASA	79
13.1 RESUMEN	80
13.2 ABSTRACT	81
13.3 INTRODUCCIÓN	82

13.4 MATERIALES Y MÉTODOS	83
13.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
13.6 CONCLUSIONES	88
13.7 REFERENCIAS	89
14. ANEXO 1	102
15. ANEXO 2 (A)	103
16. ANEXO 2 (B)	104
17. ANEXO 2 (C)	105

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

Cuadro 1. Estadística de artículos y subvenciones para Terapia Génica en general, exclusivamente en humanos en inglés, exclusivamente en animales, en perros y en gatos en todas las lenguas.	13
Cuadro 2. Distribución de estudios de terapia génica por tema de ensayo clínico en humanos, perros y gatos 1989-enero 2005.	14
Cuadro 3. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia <i>ex vivo</i> para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo.	15
Cuadro 4. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia <i>in vivo</i> para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo.	16
Cuadro 5. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia <i>in situ</i> para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo.	17
Cuadro 6. Estudios clínicos efectuados en gatos en cuanto a las estrategias para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo.	18
Cuadro 7. Analitos selectos para la evaluación de eventos adversos en hígado, riñón, páncreas, músculo, corazón e integridad celular general y del equilibrio ácido base.	52
Cuadro 8. Diseño experimental en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo.	53
Cuadro 9. Guía de grados de eventos adversos clínicos en perros.	54
Cuadro 10. Guía de grados de eventos adversos hematológicos en perros.	55
Cuadro 11. Guía de grados de eventos adversos bioquímicos en perros.	56
Cuadro 12. Guía de grados de eventos adversos del urianálisis en perros	57

Cuadro 13. Escala de grados para la atribución de eventos adversos en perros.	58
Cuadro 14. Valores de ajuste para la atribución de grados de eventos adversos en perros.	59
Cuadro 15. Captación de casos con linfosarcoma en perros (05/2004 al 01/2006)	61
Cuadro 16. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos clínicos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado.	62
Cuadro 17. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos hematológicos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado.	63
Cuadro 18. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos hepáticos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado.	65
Cuadro 19. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos del equilibrio ácido base en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado.	66
Cuadro 20. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos renales, urianálisis, musculares, cardíacos, de integridad celular y pancreáticos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado.	67

CUADROS DEL ARTÍCULO

Distribución de β -galactosidasa por transferencia adenoviral como modelo de terapia génica intralinfonodal en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo

TABLA I. HALLAZGOS CLÍNICOS DE 6 PERROS CON LINFOSARCOMA MULTICÉNTRICO ESPONTÁNEO	93
TABLA II. HALLAZGOS RADIOLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LINFOSARCOMA EN 6 PERROS CON LINFADENOMEGALIA GENERALIZADA	94
TABLA III. FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE BETA GALACTOSIDASA MEDIANTE EL SUSTRATO CROMOGÉNICO	95

X-GAL EN 6 PERROS CON LINFOSARCOMA MULTICÉNTRICO
ESPONTÁNEO A LAS 72 h POSTERIORES A LA
ADMINISTRACIÓN ILN DEL VECTOR AD5 β -GAL EN
DIFERENTES DOSIS

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Columna para purificación de adenovirus	49
Figura 2. Sistema de purificación de adenovirus con la columna acoplada a una jeringa y a un frasco contenedor	49

FIGURAS DEL ARTÍCULO

Distribución de β -galactosidasa por transferencia adenoviral como modelo de terapia génica intralinfonodal en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo

FIGURA 1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LINFOSARCOMA	96
FIGURA 2. DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO DE LINFOSARCOMA	97
FIGURA 3. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE LINFOSARCOMA	98
FIGURA 4. PRUEBA DE INFECTIVIDAD DEL ADENOVIRUS Y TRANSFERENCIA DE β -GALACTOSIDASA EN CÉLULAS HELA	99
FIGURA 5. PRUEBAS PRELIMINARES DE DISTRIBUCIÓN LINFONODAL	100
FIGURA 6. EXPRESIÓN β -GAL COMPARATIVA EN VARIOS TEJIDOS	101

2. RESUMEN

La terapia génica es la introducción de material genético a las células para generar un efecto terapéutico. El adenovirus en terapia génica de cáncer tiene amplia capacidad de transporte de genes y tipos celulares que infecta, aunque hay reportes de inflamación y toxicidad según la dosis y la vía empleada. El linfosarcoma en perros es una neoplasia maligna y representa un modelo para la evaluación y aplicación de terapia en animales y humanos. No se ha empleado la vía linfonodal para la administración de vectores. Hay escasos trabajos de terapia génica en individuos con neoplasias espontáneas. El objetivo del trabajo fue determinar la seguridad y distribución de un vector adenoviral por administración linfonodal en perros con linfosarcoma espontáneo. Se emplearon 6 perros con diagnóstico clínico, radiológico y citológico de linfosarcoma multicéntrico, 5 perros recibieron vía linfonodal una dosis de 1.35×10^{10} , 2.53×10^{10} , 6.10×10^{10} , 1.84×10^{11} o de 1.54×10^{12} PV/kg de adenovirus no replicativo portador del gen reportero Lac Z que expresa β -galactosidasa. El perro control negativo recibió sólo el vehículo. Se efectuó la evaluación clínica, hemograma, perfil bioquímico y urianálisis antes de la administración del vector y a las 12, 24, 48 y 72 h post-inoculación. Se obtuvieron muestras de linfonodos, hígado, riñones, bazo, pulmones, corazón y cerebro para determinar por medio del sustrato X-Gal la expresión de galactosidasa. No se encontraron eventos adversos clínicos, hematológicos, bioquímicos, urinarios en ninguna de las dosis empleadas asociadas al vector ni a la expresión de galactosidasa. En todos los animales el tejido linfocítico evaluado expresó galactosidasa. Los adenovirus son vectores útiles para el tratamiento génico de linfosarcoma por su seguridad y por su distribución al administrarse vía linfonodal. Estos datos crean las bases para considerar esta vía de administración como un medio sin eventos adversos para la terapia en perros con linfosarcoma y un modelo para el tratamiento de metástasis linfonodales en animales y humanos.

Palabras clave: Terapia génica, eventos adversos, perro, linfosarcoma, vía linfonodal, adenovirus.

3. ABSTRACT

Gene therapy is the introduction of genetic material to cells in order to generate a therapeutic effect. In cancer gene therapy, the adenovirus is a vector with large capacity of transport of genes and cell types of infection. According to dose and route of administration there are signs of inflammation and toxicity. Canine lymphosarcoma is a malignant neoplasia and represents a model for therapy evaluation and application in animals and human being. Lymph nodal route (ILNR) for vectors administration has never been utilized in gene therapy. There are few studies of gene therapy in patients with spontaneous neoplasia. Adenoviruses are potential vectors for gene therapy of lymphosarcoma due to safeness and distribution when they are administered by lymph nodal route. This study was conducted to assess the distribution and safeness associated with a single intralymphnodal administration of adenovirus vector in dogs with spontaneous multicentric lymphosarcoma. Six dogs with clinical, radiological and cytological diagnosis of multicentric lymphosarcoma received by lymph nodal route 1.35×10^{10} , 2.53×10^{10} , 6.10×10^{10} , 1.84×10^{11} or 1.54×10^{12} pfu/kg of non replicative adenovirus with Lac Z reporter gene which express β -galactosidase. One dog was used as a negative control and received only the vehicle. Clinical evaluation, hemogram, biochemical profile (22 analytes) and urinalysis were determined before, 12, 24, 48 and 72 h post administration. Lymph nodes, liver, kidneys, spleen, lungs, heart and cerebral samples were exposed to X-gal substrate after necropsy for galactosidase determination. No evidence of clinical, hematological biochemical nor in urinalysis adverse events was found. All of lymph tissue evaluated expressed galactosidase activity. These findings suggests that adenoviral gene therapy by ILNR is a route of safe administration without adverse events for canine lymphosarcoma therapy and a potential model for animal and human lymph node metastasis.

Key words: Gene therapy, adverse events, lymphosarcoma, lymph nodal route, adenovirus, dog.

4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

4.1 TERAPIA GÉNICA

Antecedentes de la Terapia Génica

Las estrategias terapéuticas empleadas en cáncer de animales y de la gente se han concentrado en tres áreas, la quimioterapia la radioterapia y la cirugía oncológica. En las neoplasias cuya resección quirúrgica no puede ser completa, la quimioterapia y radioterapia se emplean para eliminar las células neoplásicas proliferativas, desafortunadamente, ambas modalidades terapéuticas no son específicas, por lo tanto, también afectan a las células normales.

Varios intentos se llevaron a cabo para transferir material genético de un organismo a otro hasta que se tuvo éxito a fines de los años 70 con transferencia de genes funcionales, en 1982 se concluye un análisis ético de la Terapia Génica (TG) y es a partir de 1983 bajo condiciones de bioética se publican los primeros artículos^{1,2} y los primeros protocolos son aceptados para llevar a cabo las primeras pruebas clínicas de la TG en 1990.³

La TG consiste en introducir de manera controlada en una célula blanco un gen de interés terapéutico para corregir un defecto genético que origina una patología para tener un efecto curativo o preventivo y no solamente suprimir los signos. Las enfermedades monogénicas hereditarias fueron el blanco para el inicio de estudios por su gravedad y su condición de incurable.⁴ Las más importantes son la fibrosis quística que es provocada por la ausencia o mutación de un solo gen, que se refleja por la ausencia de una proteína de transporte membranaria ausente o defectuosa, esto resulta con la acumulación de secreciones; la hemofilia B (deficiencia del factor IX), enfermedad de Gaucher (deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa que resulta en almacenamiento lisosómico), inmunodeficiencia combinada severa (por deficiencia de adenosina desaminasa en linfocitos T), hipercolesterolemia familiar (deficiencia de receptores de lipoproteínas de baja densidad en hígado), distrofia de Duchenne (deficiencia de distrofina muscular) y la

enfermedad granulomatosa crónica (deficiencia del efecto bactericida de los fagocitos) entre otras.⁵⁻⁷

Dependiendo del tipo de terapia que se requiera, las células que reciban el o los genes terapéuticos producirán la proteína faltante o defectuosa, con el fin de reemplazarla. En el caso de las células cancerosas, la proteína terapéutica promoverá el envío de una señal para conducir hacia la muerte celular, otras proteínas terapéuticas tendrán en otros tipos celulares la función de evitar la apoptosis, sensibilizar o hacer resistentes a las células blanco a ciertos agentes terapéuticos.⁶

La TG puede llevarse a cabo en células somáticas o en células germinales (esta última no aprobada hasta la fecha en la mayoría de países incluyendo a México). En el caso de efectuarse en las células somáticas su efecto es generalmente transitorio en un tejido o varios, mientras que cuando la transferencia es en las células germinales es heredable.⁵

Para llevar a cabo la TG se deben resolver varios obstáculos técnicos:

- Conocer el gen defectuoso, su secuencia y clonarlo
- Tener un vector apropiado para transporte del gen y su transferencia a la célula blanco
- Determinar la vía de administración o tipo de transferencia
- Determinar la accesibilidad de la célula blanco para transferirle el gen terapéutico
- Conocer la biodistribución del vector
- Evitar la degradación intra y extracelular
- Determinar la dosis en una sola administración para evitar efectos indeseables
- Favorecer la evasión de la respuesta inmune y así evitar que resulte en un tratamiento ineficaz
- Regulación en la expresión del gen terapéutico (estabilidad, intensidad y duración) en las células transgénicas
- Selectividad o especificidad celular
- Integración o no al genoma celular

Transferencia de genes a las células blanco

La transferencia de genes se realiza por medio de vectores, éstos pueden ser de origen viral⁸⁻¹⁶ que transfieren por infección el gen terapéutico y los vectores no virales que transfieren el gen terapéutico por transfección.¹⁷⁻²¹

Los vectores virales son virus no patógenos modificados empleados son el adenovirus (éste es el más popular y con mayores ventajas), retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados, lentivirus (FIV), poxvirus, virus sintéticos y quimeras de otros virus, últimamente se emplean virus animales por ser mejor tolerados en el humano, dentro de éstos se incluye el del Newcastle.²²

Dentro de la terapéutica se requiere definir si se necesita como vector a un virus replicativo o no replicativo, su selección también está en relación con su capacidad de transporte y de infección a células en división (metafase), en interfase o en ambas.⁸ Los virus constituyen excelentes vectores, pues evitan ser destruidos por el sistema inmunitario, se ocupan de insertar su material genético con el gen terapéutico en las células blanco, las cuales las identifican por sus receptores específicos. Una vez el gen terapéutico al interior de la célula del paciente, toma el control de la maquinaria celular y logra que se produzcan proteínas terapéuticas. Es la capa viral protectora la que permite la introducción del material genético.²³⁻²⁵ Los adenovirus son los preferidos por su elevada capacidad de transporte (37 kb),²⁶ y porque pueden infectar células en división y en interfase.¹⁸ Los retrovirus fueron los primeros empleados, pueden tener una expresión a largo plazo. No son capaces de infectar a células en interfase (p.e. neuronas, miocitos, células pulmonares o hepáticas), por lo tanto, son ideales en neoplasias intracraneales, pues solamente afectan a las células que se dividen activamente y no afectan a las neuronas.⁵ Pero por su integración al genoma y la posibilidad de producir cáncer como sucedió con los niños burbuja (con inmunodeficiencia combinada severa), evolucionaron hacia una leucemia en 3 de 10 niños en un estudio en Francia,²⁷ a partir de esto, se frenaron los estudios de la TG o se han prohibido en algunos países su empleo cuando menos con retrovirus.

Los vectores no virales más empleados son liposomas catiónicos, polímeros catiónicos y métodos físicos como la electroporación, la microinyección (ADN desnudo, conjugados moleculares) y la biobalística (por medio de una pistola para disparar pequeñas balas de oro o de plástico acoplados con los genes hacia los tejidos de interés). Los liposomas son pequeñas vesículas de moléculas lipídicas capaces de transportar ADN terapéutico dentro de ellas. La utilización de vectores no virales aunque es de menor costo, puede requerir de la inyección directa de ADN del plásmido (ADN circular) o una mezcla de éste con compuestos que le permitan atravesar la membrana celular y de impedir que el ADN se degrade.²⁸

La eficiencia de transferencia de estos métodos es muy pobre comparada con los vectores virales, la duración de la expresión es muy corta, sin embargo, éstos no contienen genes virales, por lo tanto, no pueden provocar enfermedad alguna.¹⁸

Los tipos de administración de la TG son 3:

TG ex vivo. Consiste en tomar del paciente células blanco para modificarlas genéticamente por medio de un vector portador del gen terapéutico, después de infectadas o transfectadas, se reintroducen en el paciente. Este método se emplea particularmente en células sanguíneas que son fáciles de obtener y de reintroducir.

TG in situ. El vector de transferencia se inyecta directamente al tejido blanco. Un ejemplo clásico son las neoplasias, sobre todo las intracraneales.

TG in vivo. Consiste en inyectar o aplicar al vector con el gen terapéutico de interés directamente a la circulación sanguínea o en cualquier parte del cuerpo y tener un efecto sistémico.²⁹

Dentro de la terapia, es importante que las células infectadas o transfectadas utilicen su maquinaria para producir las proteínas terapéuticas y según convenga el sistema empleado, también que produzcan nuevas partículas virales o no.

Indicaciones de la terapia génica

En enfermedades hereditarias monogénicas

En cáncer

En enfermedades infecciosas³⁰

La TG en cáncer se ha desarrollado mucho en los últimos años. Tomando en consideración que el cáncer es un problema de índole genético de células somáticas que se caracteriza por proliferación ilimitada. Los genes protagonistas de la carcinogénesis, pueden pertenecer a uno de dos grupos antagónicos:

- los pro-carcinogénicos denominados oncogenes y
- los que suprimen la formación de tumores llamados genes supresores de tumor.

Se calcula que hay cien oncogenes y cien genes supresores aproximadamente en el genoma humano. Los primeros pueden producir cáncer cuando su estructura se altera por mutaciones, translocaciones o por pérdidas parciales o totales de su secuencia. Pero además de los cambios en los oncogenes, la carcinogénesis implica también la pérdida de la función de uno o múltiples genes supresores en prácticamente todos los cánceres humanos. Los genes supresores, al sufrir mutaciones o pérdidas parciales o totales de su secuencia, dejarán de suprimir algunos pasos que evitan la carcinogénesis en las células. De esta forma, la carcinogénesis se concibe actualmente como la suma de la activación de oncogenes asociada a la inactivación de genes supresores (en número y secuencia) variables en cada cáncer y para cada paciente.¹⁸

La gran mayoría de agentes o medios terapéuticos anticancerosos actuales son tratamientos paliativos o simplemente administrados para mejorar la calidad de vida.

Numerosos tipos de terapia anticancerosa se han empleado, los más populares son los siguientes:

- Quimioterapia
- Radioterapia

- Hipertermia
- Crioterapia
- Mixtos
- Inmunoterapia (Modificadores de la respuesta biológica) como el BCG, levamisol, anticuerpos monoclonales, citocinas, factores de crecimiento y vacunas.
- Cirugía
- Terapia Génica

Además de otros que en humanos pueden dar bienestar al paciente como la psicoterapia, herbolaria, homeopatía, etc.

Estrategias de la TG de cáncer para tratar de destruir las células cancerosas:

1. **Reemplazo de genes defectuosos o incremento de oncosupresores.** El caso clásico es empleando la proteína 53 (p53) que favorece la apoptosis.
2. **TG suicida.** En esta modalidad se transfiere a las células cancerosas un gen capaz de codificar una proteína con función enzimática. El objetivo de producir esa enzima, es que sea capaz de convertir selectivamente dentro de las células neoplásicas, un pro-fármaco no tóxico en un fármaco altamente letal para las células que produzcan esa enzima. De tal suerte que al inyectar el pro-fármaco en el paciente, se lograría la inducción de la muerte de las células neoplásicas modificadas genéticamente sin producir la toxicidad sistémica de la quimioterapia convencional. Además, las células circundantes pueden morir al entrar en contacto con el producto tóxico una vez que difunda al exterior de la célula dañada. A este fenómeno se le ha denominado el efecto “de espectador”. Hay varios sistemas para llevarlo a cabo, los más comunes son el gen de la desaminasa de adenosina⁷ (convierte 5 fluorocitosina en 5 fluorouracilo altamente tóxico) y el gen de la timidina cinasa que transforma el ganciclovir (forma inactiva) en ganciclovir fosforilado altamente letal para las células.^{7,18}

3. **TG proapoptósica.** Se efectúa incrementando proteínas que favorecen la apoptosis como Bax, TNF, etc, rompiendo el equilibrio de proteínas antiapoptósicas y proapoptósicas.
4. **TG de células cancerosas autólogas como vectores de virus oncolíticos.** Empleado como terapia anticancerosa de neoplasias metastásicas³¹ o inhibición del poder de metástasis como se realiza con nm23.¹⁸
5. **Oligonucleótidos antisentido.** El ARN mensajero es leído por los ribosomas para llevar a cabo la síntesis de una proteína. Un fármaco antisentido es un oligonucleótido complementario a la cadena simple de ARN, lo que al ligarse al ARN mensajero, hace que sea ilegible para el ribosoma, por lo tanto, no se produce la proteína específica. De esta manera se pueden bloquear los oncogenes.
6. **Inmunomodulación.** Las células cancerosas escapan a la respuesta inmunológica que frecuentemente es de intensidad limitada y poca duración. Esta estrategia es la que ha imperado en los últimos años. El objetivo es potenciar la respuesta inmunológica antineoplásica (mediante la modificación de linfocitos T ex vivo, generación de inflamación local, vacunas con ADN, inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales contra antígenos solubles de células cancerosas o antígenos de superficie de estas células).⁷
7. **Protección de células hemopoyéticas troncales.** Para evitar la destrucción de células de la médula ósea cuando se lleva a cabo quimioterapia. Se introduce el gen de Resistencia a Múltiples Fármacos” (MDR por sus siglas en inglés: Multi Drug Resistance) que produce la glucoproteína P que funciona como una bomba transmembranaria que bombea los fármacos al exterior de las células impidiendo su efecto tóxico.³²
8. **Radiosensibilización o quimiosensibilización como con p53.**¹⁸
9. **TG antiangiogénica.** El objetivo es las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Esta modalidad tiene la finalidad de evitar metástasis distantes y puede emplearse después de la radioterapia o de la cirugía de la

neoplasia primaria, o en combinación con la quimioterapia o inmunoterapia y de otros tipos de TG.⁷

Evolución de la investigación de la TG desde su inicio

Tomando en consideración a partir de las primeras pruebas clínicas, se presenta una evolución de los últimos 15 años en cuanto a su productividad, subvenciones en términos generales y en perros y gatos específicamente. (cuadro 1).

Distribución de estudios por tema de ensayo clínico en humanos, perros y gatos desde 1990 hasta 2004

Los estudios clínicos empleando terapia génica se han concentrado en su mayoría con una aplicación en oncología en humanos, mientras que en perros y gatos tiene una distribución más equilibrada. (Cuadro 2)

Hasta donde se tiene conocimiento, en México solamente hay un estudio en fase clínica I en oncología veterinaria y que es motivo de esta tesis bajo el título de “Determinación de la Seguridad y Distribución de un Vector Adenoviral para la Terapia Génica en Perros con Linfosarcoma Espontáneo”, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Instituto Nacional de Rehabilitación de la SSA y en el Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos.

La proporción de estudios efectuados en perros en cuanto a la estrategia de introducción de genes terapéuticos o marcadores ha sido variada: de 84 trabajos presentados, el 40.48 % fueron con infección o transfección ex vivo (cuadro 3), el 36.9 % fueron in vivo (cuadro 4) y con 22.62 % de las publicaciones con la estrategia in situ (cuadro 5). Mientras que en gatos, de 15 trabajos, las proporciones fueron de 33.33 %, 26.67 % y 40.0 % respectivamente (cuadro 6).

Los vectores más empleados son el adenovirus con 32.5 %, retrovirus 30.1 %, virus adenoasociados 16.9 % y otros virus y vectores no virales 20.5 %.

Las investigaciones clínicas en casos de cáncer en perros, se ha hecho en neoplasias espontáneas en el 42.86 % de todos los trabajos mientras que en gatos es en el 100 %.

El concepto de la terapia génica resulta una estrategia muy interesante para la solución de patologías de origen genético, infeccioso, neoplásico e inmunomediado y puede servir para reemplazar proteínas, hormonas o enzimas faltantes después de un evento patológico. Se tiene la impresión que dentro de unos años, la terapia que conocemos ahora va a ser muy distinta desde el punto de vista preventivo y curativo. Actualmente también es inobjetable que aún se tienen muchos problemas en la especificidad de las células blanco, en la presencia de eventos adversos y en la insuficiente duración de los efectos de los genes terapéuticos en varias enfermedades. Éstos se deberán resolver paulatinamente en los próximos años mediante trabajos de investigación multidisciplinarios y de desarrollo.

Cuadro 1. Artículos y subvenciones para terapia génica en general, exclusivamente en humanos en inglés, exclusivamente en animales, en perros y en gatos en todas los idiomas

Estadística	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Nº Artículos ^a Humanos	175	163	248	381	563	714	823	891	995	1224	1550	1509	1570	1580	1112
Nº subvenciones ^b General	561	610	698	801	960	993	309	1569	1810	2180	2368	2549	2741	2853	2738
Nº subvenciones Humanos ^c	420	450	504	582	689	691	164	1129	1280	1530	1638	1689	1810	1855	1743
Nº subvenciones Animales ^d	72	118	157	186	234	230	29	412	499	615	686	837	919	1012	1005
Nº subvenciones Caninos ^e	6	7	10	11	15	18	2	16	25	23	22	22	25	33	26
Felinos ^f	3	2	3	3	4	5	0	4	6	7	7	16	22	18	13
Nº de artículos ^g Todas especies	267	359	486	735	1026	1435	1624	1810	2089	2460	3062	3044	3239	3462	3674
Nº de artículos Caninos ^h	2	2	4	8	5	4	9	9	11	16	14	11	16	17	15
Felinos ⁱ	1	1	1	0	0	0	1	1	0	4	3	2	2	0	4
Ensayos clínicos Caninos ^j	1	1	1	2	4	3	5	6	7	10	9	5	15	15	8
Felinos ^k	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	1	1	1	0	1

^a Publicaciones sobre Terapia Génica en humanos en revistas en inglés ³³

^b Subvenciones para Terapia Génica de cualquier tipo y especie, sólo en humanos^c, en animales^d, perros^e y gatos^f. Seleccionados si terapia génica aparece en su título o resumen. Limitado a EUA. Institutos y Centros de Investigación. Computer Retrieval of Information on Scientific Projects (CRISP) database (<http://crisp.cit.nih.gov>) 1990-2004. 22/03/05

^g Todos los artículos publicados de Terapia Génica en todas las especies y lenguas; en perros^h y gatosⁱ. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

^j Publicación de ensayos clínicos en perros^j y gatos^k. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Cuadro 2. Distribución de estudios de terapia génica por tema de ensayo clínico en humanos, perros y gatos 1989-enero 2005

	Humanos ^a (n)	Perros ^b (n)	Gatos ^c (n)
Cáncer	66.2 % (675)	8.4 % (7)	13.3 % (2)
Enfermedades monogénicas	9.1 % (93)	44.6 % (37)	40 % (6)
Enfermedades cardiovasculares	8.3 % (85)	0.0 % (0)	0.0 % (0)
Enfermedades infecciosas	6.7 % (68)	0.0 % (0)	0.0 % (0)
Otras enfermedades	3.0 % (31)	2.4 % (2)	0.0 % (0)
Marcado genético	5.1 % (52)	0.0 % (0)	0.0 % (0)
Individuos sanos	1.6 % (16)	44.6 % (37)	46.7 % (7)

^a Según los datos obtenidos del Gene Therapy Clinical Trials Worldwide en el Journal of Gene Medicine www.wiley.co.uk/genmed/clinical 22/03/05.

^{b,c} Seleccionados si terapia génica aparece en su título o resumen en perros y gatos 25/06/05. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Cuadro 3. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia *ex vivo* para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo^a

Tipo de vector	Vía de introducción	Nombre del Gen	Tipo de gen	Enfermedad objetivo
Retrovirus	CD34+ Intramedular	Metilguanina metiltransfera	Protector	Protección de médula ósea ³⁴
Lentivirus	CD34+ Intravenosa	Proteína verde fluorescente	Reportero	Reemplazo en médula ósea ³⁵
Adenovirus	Injerto de vena safena	LacZ	Reportero	Enfermedad coronaria ³⁶
?	Implante intraventricular de células renales caninas	Alfa-iduronidasa canino	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VII ³⁷
Retrovirus	CD34+ Intramedular	Metilguanina metiltransferasa	Terapéutico	Protección de médula ósea ³⁸
Adenovirus	Injerto vena femoral	rTGFbeta	Terapéutico	Aneurisma ³⁹
Adenovirus	Injerto de vena safena	LacZ	Reportero	Arterioesclerosis de injerto ⁴⁰
Retrovirus	Injerto células troncales	Resistencia a varios fármacos	Protector	Protección de médula ósea ⁴¹
Retrovirus	Linfocitos autógenos	Timidina cinasa	Terapéutico	Rechazo de injertos ⁴²
Retrovirus	CD34+ Intramedular	Fibronectina	Terapéutico	Repoblación médula ósea ⁴³
Retrovirus	Intrauterina con Células troncales	Iduronidasa	Terapéutico	Mucopolisacaridosis I ⁴⁴
Retrovirus	Intrauterina con Células troncales	Alfa-L-Iduronidasa	Terapéutico	Mucopolisacaridosis I ⁴⁵
Retrovirus	Intravenosa con células de médula ósea alógenas	Cadenas gamma humanas	Terapéutico	Inmunodeficiencia combinada severa hereditaria ⁴⁶
Plásmido	Intradérmica de células neoplásicas	hGM-CSF	Terapéutico	Cáncer ⁴⁷
Retrovirus	Intramedular de Células troncales autólogas	Alfa-L-Fucosidasa	Terapéutico	Fucosidosis ⁴⁸
Plásmido	Intramedular de Células troncales autólogas	Factor IX y Factor de crecimiento humanos	Terapéutico	Hemofilia B ⁴⁹
Retrovirus	Trasplante de células de tiroides autólogas	LacZ	Reportero	Tiroides ⁵⁰
Retrovirus	Trasplante de hepatocitos vía portal	Alfa 1- antitripsina humana	Terapéutico	Deficiencias hepáticas ⁵¹
Retrovirus	Trasplante células troncales autólogas	Dihidrolato reductasa o neomicina fosfotransferasa	Terapéutico	Protección de médula ósea ⁵²

^a Seleccionados si el nombre de terapia génica en perros aparece en su título o resumen (25/06/05). National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Cuadro 4. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia *in vivo* para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo

Tipo de vector	Vía de introducción	Nombre del Gen	Tipo de gen	Enfermedad objetivo
Retrovirus	Intravenosa	Factor VIII canino	Terapéutico	Hemofilia A ⁵³
Adenoasociado 2/8	Intraportal	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁵⁴
Péptido sintético	Intravenosa	CTLA-4 y CH2-CH3	Terapéutico	Lupus Eritematoso Sistémico ⁵⁵
Adenovirus	Cisterna magna	Superóxido dismutasa	Terapéutico	Vasoespasma cerebral ⁵⁶
Retrovirus	Intravenosa	beta-glucuronidasa canina	Terapéutico	Cardiopatía en MPS VII ⁵⁷
Músculo liso vascular	Intracoronaria	Factor de crecimiento endotelial vascular	Terapéutico	Oclusión coronaria ⁵⁸
Retrovirus	Intravenosa neonatal	beta-glucuronidasa canina	Terapéutico	Artropatía en MPS VII ⁵⁹
Adenovirus	Atrioventricular izq.	HCN2	Terapéutico	Marcapasos cardíaco ⁶⁰
Adenovirus	Intravenosa	Factor VIII canino	Terapéutico	Hemofilia A ⁶¹
Virus Adenoasociado 2	Intraportal	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁶²
Virus Adenoasociado 2	(?)	Gen correctivo (?)	Terapéutico	Amaurosis Congénita ⁶³
Adenovirus	Intravenosa	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁶⁴
Lentivirus	Intramuscular	Factor estimulante de colonias de granulocitos	Terapéutico	Neutropenia cíclica ⁶⁵
Virus Adenoasociado 2	Intraportal	Factor VIII canino	Terapéutico	Hemofilia A ⁶⁶
Retrovirus	Intravenoso	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁶⁷
Adenovirus	Intra muscular en vejiga	Colágeno alfa 5 (IV)	Terapéutico	Síndrome de Alport ⁶⁸
Adenovirus	Intravenoso	Factor VIII canino	Terapéutico	Hemofilia A ⁶⁹
Retrovirus	Intrauterino	alpha-L-iduronidase canino	Terapéutico	Mucopolisacaridosis I ⁷⁰
Retrovirus	Intravenosa	beta-glucuronidasa canina	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VII ⁷¹
Virus Adenoasociado	Intravenosa	glucosa-6-fosfatasa canina	Terapéutico	Acumulación de glucógeno I ⁷²
Virus Adenoasociado	Intramuscular	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁷³
Retrovirus	Intravenosa	beta-glucuronidasa canina	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VII ⁷⁴
Virus Adenoasociado	Intramuscular	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁷⁵
Adenovirus	Intravenoso	Factor VIII canino	Terapéutico	Hemofilia A ⁷⁶
Virus adenoasociado 2	Intramuscular	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁷⁷
Virus adenoasociado 2	Intramuscular	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁷⁸
Virus adenoasociado 2	intramuscular	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁷⁹
Adenovirus	Intravenosa	Factor VIII humano	Terapéutico	Hemofilia A ⁸⁰
Plásmido	Intramuscular	alpha-L-iduronidase canino	Terapéutico	Mucopolisacaridosis I ⁸¹
Partícula-mediada	Intravenosa	Varias citocinas	Terapéutico	Cáncer ⁸²
Adenovirus	Intravenosa	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁸³

^a Seleccionados si el nombre de terapia génica en perros aparece en su título o resumen (25/06/05). National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Cuadro 5. Estudios clínicos efectuados en perros en cuanto a la estrategia *in situ* para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo

Tipo de vector	Vía de introducción	Nombre del Gen	Tipo de gen	Enfermedad objetivo
Retrovirus	Intravesical	LacZ y Neo R	Reportero	Neoplasia de vejiga ⁸⁴
ADN desnudo	Intratumoral	Fas ligand	Terapéutico	Melanoma ⁸⁵
Liposoma	Intratumoral	Enterotoxina de <i>S. aureus</i>	Terapéutico	Varias neoplasias ⁸⁶
Virus Adenoasociado 2	Subrretinal	Proteína Verde Fluorescente	Reportero	Retinopatía adquirida o hereditaria ⁸⁷
Adenovirus	Intraprostático	Timidina cinasa	Terapéutico	Hiperplasia prostática ⁸⁸
Adenovirus	Intramuscular	Utrofina	Terapéutico	Distrofia muscular ⁸⁹
Adenovirus	Intra atrio izquierdo	HCN2	Terapéutico	Marcapasos cardíaco ⁹⁰
Adenovirus	Intratumoral	Linamarasa	Terapéutico	Glioblastoma ⁹¹
Virus hemaglutinante de Japón	Intramiocardio ventricular izquierdo	Factor de crecimiento de hepatocitos	Terapéutico	Insuficiencia cardíaca ⁹²
Plásmido desnudo	Intramiocardio ventricular izquierdo	Proteína Verde Fluorescente	Reportero	Cardiopatía isquémica ⁹³
Plásmido desnudo	Arteria Coronaria izq.	Factor natriurético atrial	Terapéutico	Cardiopatía isquémica ⁹⁴
Virus Adenoasociado	Vena mesentérica	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ⁹⁵
Adenovirus	Líquido cerebroespinal	Óxido nítrico sintetasa	Terapéutico	Vasoespasma cerebral ⁹⁶
Adenovirus	Intraprostático	LacZ	Reportero	Cáncer prostático ⁹⁷
Adenovirus	Cámara anterior e iris	LacZ	Reportero	Melanoma de uvea ⁹⁸
Virus canarypox	Intraprostático	LacZ	Reportero	Neoplasia prostática ⁹⁹
Plásmido desnudo	Intrasinovial	LacZ	Reportero	Lesiones tendinosas ¹⁰⁰
Retrovirus	Intrahepático (células empaquetadoras)	Timidina cinasa	Terapéutico	Neoplasias hepáticas ¹⁰¹
Retrovirus	Intraperitoneal (células empaquetadoras)	Timidina cinasa	Terapéutico	Neoplasias peritoneales ¹⁰²
Virus Adenoasociado	Intraportal	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ¹⁰³
Adenovirus	Intrapericárdica	Factor de crecimiento endotelial vascular y LacZ	Terapéutico	Oclusión coronaria ¹⁰⁴
Adenovirus	Intraprostático	LacZ	Reportero	Neoplasias prostáticas ¹⁰⁵
adenovirus y retrovirus	Lesión (coágulo con virus)	LacZ	Reportero	Daño de meniscos ¹⁰⁶
Adenovirus	Intraprostática	LacZ	Reportero	Neoplasias prostáticas ¹⁰⁷
Virus Adenoasociado	Intrahepático	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ¹⁰⁸
Adenovirus	Intraprostática	LacZ	Reportero	Neoplasias prostáticas ¹⁰⁹
ADN en polímero	Intramiocárdica de atrio	Fosfatasa alcalina estable	Reportero	Cardiopatías ¹¹⁰
Liposomas	Intraneoplásico	Enterotoxina B/estafilococo	Terapéutico	Melanomas ¹¹¹
Adenovirus	Intraarterial de la región	LacZ	Reportero	Meningioma ¹¹²
Retrovirus	Intramuscular e intraperitoneal	Distrofina canino	Terapéutico	Distrofia muscular ¹¹³
Adenovirus	Intramedular	GM-CSF canino	Terapéutico	Hematopoyesis ¹¹⁴
Adenovirus	Intraportal	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ¹¹⁵
Retrovirus	Intraportal	Factor IX canino	Terapéutico	Hemofilia B ¹¹⁶
Liposomas	Intracoronaria	LacZ y Luciferasa	Reportero	Enfermedad Cardiovascular ¹¹⁷

^a Seleccionados si el nombre de terapia génica en perros aparece en su título o resumen (25/06/05). National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Cuadro 6. Estudios clínicos efectuados en gatos en cuanto a las estrategias para la introducción de genes terapéuticos o marcadores efectuada, tipo de vector y enfermedad objetivo

Estrategia	Tipo de vector	Vía de introducción	Nombre del Gen	Tipo de gen	Enfermedad objetivo
<i>Ex vivo</i>	Retrovirus	Fibroblastos autólogos en cápsula renal	N-acetilgalactosamina 4 sulfatasa	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VI ¹¹⁸
	Retrovirus	Células troncales autólogas vía intravenosa	Arilsulfatasa b humana	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VI ¹¹⁹
	Retrovirus	Trasplante de médula ósea autógena	Alfa-manosidasa	Terapéutico	Alfa-manosidosis ¹²⁰
	Retrovirus	Trasplante de médula ósea autógena	Resistencia a la neomicina	Terapéutico	Protección de médula ósea ¹²¹
	Retrovirus	Trasplante de médula ósea autógena	Resistencia a la neomicina	Terapéutico	Protección de médula ósea ¹²²
<i>In vivo</i>	Virus Adenoasociado	Intramuscular	Eritropoyetina felina	Terapéutico	Anemias no regenerativas ¹²³
	Virus Adenoasociado	Intramuscular	Eritropoyetina felina	Terapéutico	Anemias no regenerativas ¹²⁴
	Virus Adenoasociado	Intravenosa	Lipoproteína lipasa	Terapéutico	Hiperlipoproteinemia ¹²⁵
	Adenovirus	Intramuscular	N-acetilgalactosamina 4 sulfatasa	Terapéutico	Mucopolisacaridosis VI ¹²⁶
	Retrovirus				
<i>In situ</i>	Virus Adenoasociado	Cerebro	Alfa-manosidasa	Terapéutico	Alfa-manosidosis ¹²⁷
	Lentivirus	Cámara anterior del ojo	LacZ y Verde Fluorescente	Reportero	Glaucoma ¹²⁸
	Virus Adenoasociado	Subretinal o intravitreo	N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa	Terapéutico	Mucopolisacaridosis IV ¹²⁹
	Células Vero	Intratumoral	Interleucina-2 humana	Terapéutico	Metástasis de cáncer ¹³⁰
	Células Vero	Intratumoral	Interleucina-2 humana	Terapéutico	Fibrosarcoma ¹³¹
	ADN desnudo	Intrahepática	Alfa I antitripsina	Terapéutico	Hepatopatía ¹³²

^a Seleccionados si el nombre de terapia génica en gatos aparece en su título o resumen (25/06/05). National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

REFERENCIAS

1. Joyner A, Keller G, Phillips R, Bernstein A. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 1983;305:556-558.
2. Miller AD, Jolly DJ, Friedman T, Verma IM. A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:4709-4713.
3. American Society of Gene Therapy. Brief History of Gene Therapy. 2005.
4. Vassaux G. Gene therapy for monogenic diseases. In: Lemoine NR, ed. *Understanding Gene Therapy*. NY, USA: BIOS Scientific Publishers Limited, 1999:71-82.
5. Cox TM, Sinclair J. Terapia Génica. In: Cox T, Sinclair J, eds. *Biología Molecular en Medicina*. España: Editorial Médica Panamericana, 1998:304-319.
6. Lemoine NR. *Understanding Gene Therapy*. London, UK: Bios Scientific Pub. Springer, 1999.
7. Brand K, Wolff G, Strauss M. Gene Therapy for Cancer. In: Nancy Smith Templeton, Danilo D. Lasic, eds. *Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000:439-472.
8. Burton EA, Huang S, Goins W, Glorioso J. *Viral Vectors for Gene Therapy. Methods and Protocols*. New Jersey, USA: Humana Press, 2003.
9. Allen C, McDonald C, Giannini C, Peng KW, Rosales G, Russell SJ, Galanis E. Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas. *J Gene Med* 2004;6:1216-1227.

10. Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 2004;2:9.
11. Blechacz B, Russell SJ. Parvovirus vectors: use and optimisation in cancer gene therapy. *Expert Rev Mol Med* 2004;6:1-24.
12. Buning H, Braun-Falco M, Hallek M. Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Cells Tissues Organs* 2004;177:139-150.
13. Duan YY, Wu J, Zhu JL, Liu SL, Ozaki I, Strayer DS, Zern MA. Gene therapy for human alpha1-antitrypsin deficiency in an animal model using SV40-derived vectors. *Gastroenterology* 2004;127:1222-1232.
14. Jia W, Zhou Q. Viral vectors for cancer gene therapy: viral dissemination and tumor targeting. *Curr Gene Ther* 2005;5:133-142.
15. Klink D, Schindelhauer D, Laner A, Tucker T, Bebok Z, Schwiebert EM, Boyd AC, Scholte BJ. Gene delivery systems--gene therapy vectors for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3 Suppl 2:203-212.
16. Lundstrom K. Gene therapy applications of viral vectors. *Technol Cancer Res Treat* 2004;3:467-477.
17. Kamps J, Scherphof, GL. Liposomes in biological systems. In: Torchilin V, Weissig V, eds. *Liposomes. A Practical Approach*. Boston, USA: Oxford University Press, 2003:267-288.
18. Gutiérrez AA, González, D, Luz, A, Landa, C. Producción de agentes biológicos para la terapia celular y génica en humanos. In: Mas O.J., ed. *Diagnóstico Molecular en Medicina*. México: Manual Moderno, 2004:265-291.
19. Montier T, Delepine P, Pichon C, Ferec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol* 2004;22:586-592.

20. Agarwal A, Unfer R, Mallapragada SK. Novel cationic pentablock copolymers as non-viral vectors for gene therapy. *J Control Release* 2005;103:245-258.
21. Reszka RC, Jacobs A, Voges J. Liposome-mediated suicide gene therapy in humans. *Methods Enzymol* 2005;391:200-208.
22. Bian H., Fournier P, Moormann R, Peeters B, Schirmacher V. Selective gene transfer in vitro to tumor cells via recombinant Newcastle disease virus. *Cancer Gene Ther* 2005;12:295-303.
23. Strayer DS. Viral vectors for gene therapy: Past, present and future. *Drug News Perspect* 1998;11:277-286.
24. Lundstrom K. Gene therapy applications of viral vectors. *Technol Cancer Res Treat* 2004;3:467-477.
25. Jia W, Zhou Q. Viral vectors for cancer gene therapy: viral dissemination and tumor targeting. *Curr Gene Ther* 2005;5:133-142.
26. Hackett N, Cristal, RG. Adenovirus vectors for Gene Therapy. In: Templeton N, Lasic DD, eds. *Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies*. New York, USA: Mercel Dekker, 2000:17-40.
27. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 2005;433:561.
28. Miller AD. Nonviral delivery systems for gene therapy. In: Lemoine NR, ed. *Understanding Gene Therapy*. NY, USA: BIOS Scientific Publishers Limited, 1999:43-69.
29. Drew, Martin, LA. What is gene therapy? In: Lemoine NR, ed. *Understanding Gene Therapy*. NY, USA: BIOS Scientific Publishers, Lte, 1999:1-10.

30. Martin LA, Drew, J. Why gene therapy? In: Lemoine NR, ed. Understanding Gene Therapy. New York, USA: BIOS Scientific Publishers Limited, 1999:11-19.
31. García-Castro J, Martínez-Palacio J, Lillo R, García-Sánchez F, Alemany R, Madero L., Bueren JA, Ramírez M. Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors. *Cancer Gene Therapy* 2005;12:341-349.
32. Jin Sun Z-GHGCS-JWX-HHM-JZ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit* 2004;10:RA5-RA14.
33. Crofts C., Krinsky S. Review Emergence of a Scientific and Commercial Research and Development Infrastructure for Human Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 2005;16:169-177.
34. Neff T, Beard BC, Peterson LJ, Anandakumar P, Thompson J, Kiem HP. Polyclonal chemoprotection against temozolomide in a large-animal model of drug resistance gene therapy. *Blood* 2005;105:997-1002.
35. Horn PA, Keyser KA, Peterson LJ, Neff T, Thomasson BM, Thompson J, Kiem HP. Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* 2004;103:3710-3716.
36. Petrofski JA, Hata JA, Gehrig TR, Hanish SI, Williams ML, Thompson RB, Parsa CJ, Koch WJ, Milano CA. Gene delivery to aortocoronary saphenous vein grafts in a large animal model of intimal hyperplasia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:27-33.
37. Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth SA, Chang PL. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med* 2003;142:399-413.
38. Neff T, Horn PA, Peterson LJ, Thomasson BM, Thompson J, Williams DA, Schmidt M, Georges GE, von Kalle C, Kiem HP. Methylguanidine

methyltransferase-mediated in vivo selection and chemoprotection of allogeneic stem cells in a large-animal model. *J Clin Invest* 2003;112:1581-1588.

39. Ribourtout E, Desfaits AC, Salazkin I, Raymond J. Ex vivo gene therapy with adenovirus-mediated transforming growth factor beta1 expression for endovascular treatment of aneurysm: results in a canine bilateral aneurysm model. *J Vasc Surg* 2003;38:576-583.

40. Chiu-Pinheiro CK, O'Brien T, Katusic ZS, Bonilla LF, Hamner CE, Schaff HV. Gene transfer to coronary artery bypass conduits. *Ann Thorac Surg* 2002;74:1161-1166.

41. Licht T, Haskins M, Henthorn P, Kleiman SE, Bodine DM, Whitwam T, Puck JM, Gottesman MM, Melniczek JR. Drug selection with paclitaxel restores expression of linked IL-2 receptor gamma -chain and multidrug resistance (MDR1) transgenes in canine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3123-3128.

42. Weissinger EM, Franz M, Voss C, Bonini C, Kremmer E, Kolb HJ. Expression of HSV-TK suicide gene in primary T lymphocytes: the dog as a preclinical model. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:25-33.

43. Goerner M, Bruno B, McSweeney PA, Buron G, Storb R, Kiem HP. The use of granulocyte colony-stimulating factor during retroviral transduction on fibronectin fragment CH-296 enhances gene transfer into hematopoietic repopulating cells in dogs. *Blood* 1999;94:2287-2292.

44. Lutzko C, Omori F, Abrams-Ogg AC, Shull R, Li L, Lau K, Ruedy C, Nanji S, Gartley C, Dobson H, Foster R, Kruth S, Dube ID. Gene therapy for canine alpha-L-iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease. *Hum Gene Ther* 1999;10:1521-1532.

45. Lutzko C, Kruth S, Abrams-Ogg AC, Lau K, Li L, Clark BR, Ruedy C, Nanji S, Foster R, Kohn D, Shull R, Dube ID. Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility in canine alpha-L-iduronidase deficiency. *Blood* 1999;93:1895-1905.
46. Whitwam T, Haskins ME, Henthorn PS, Kraszewski JN, Kleiman SE, Seidel NE, Bodine DM, Puck JM. Retroviral marking of canine bone marrow: long-term, high-level expression of human interleukin-2 receptor common gamma chain in canine lymphocytes. *Blood* 1998;92:1565-1575.
47. Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, Albertini MR, Dubielzig RR, Keller ET, Yang NS, Macewen EG. Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines for the treatment of spontaneous canine cancer. *Hum Gene Ther* 1998;9:1851-1861.
48. Ferrara ML, Occhiodoro T, Fuller M, Hawthorne WJ, Teutsch S, Tucker VE, Hopwood JJ, Stewart GJ, Anson DS. Canine fucosidosis: a model for retroviral gene transfer into haematopoietic stem cells. *Neuromuscul Disord* 1997;7:361-366.
49. Hurwitz DR, Kirchgesser M, Merrill W, Galanopoulos T, McGrath CA, Emami S, Hansen M, Cherington V, Appel JM, Bizinkauskas CB, Brackmann HH, Levine PH, Greenberger JS. Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther* 1997;8:137-156.
50. O'Malley BW, Jr., Ledley FD. DNA- and viral-mediated gene transfer in follicular cells: progress toward gene therapy of the thyroid. *Laryngoscope* 1993;103:1084-1092.
51. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, Liu T, Finegold M, Darlington G, Pokorny W, . Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:89-93.

52. Stead RB, Kwok WW, Storb R, Miller AD. Canine model for gene therapy: inefficient gene expression in dogs reconstituted with autologous marrow infected with retroviral vectors. *Blood* 1988;71:742-747.
53. Xu L, Nichols TC, Sarkar R, McCorquodale S, Bellinger DA, Ponder KP. Absence of a desmopressin response after therapeutic expression of factor VIII in hemophilia A dogs with liver-directed neonatal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6080-6085.
54. Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, Wilson JM. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 2005;105:3079-3086.
55. Choi EW, Shin IS, Youn HY, Kim DY, Lee H, Chae YJ, Lee CW. Gene therapy using non-viral peptide vector in a canine systemic lupus erythematosus model. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103:223-233.
56. Yamaguchi M, Zhou C, Heistad DD, Watanabe Y, Zhang JH. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase failed to prevent cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004;35:2512-2517.
57. Sleeper MM, Fornasari B, Ellinwood NM, Weil MA, Melniczek J, O'Malley TM, Sammarco CD, Xu L, Ponder KP, Haskins ME. Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII. *Circulation* 2004;110:815-820.
58. Hattan N, Wartier D, Gu W, Kolz C, Chilian WM, Weihrauch D. Autologous vascular smooth muscle cell-based myocardial gene therapy to induce coronary collateral growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H488-H493.
59. Mango RL, Xu L, Sands MS, Vogler C, Seiler G, Schwarz T, Haskins ME, Ponder KP. Neonatal retroviral vector-mediated hepatic gene therapy reduces

bone, joint, and cartilage disease in mucopolysaccharidosis VII mice and dogs. *Mol Genet Metab* 2004;82:4-19.

60. Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L, Janse MJ, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB, Danilo P, Jr., Rosen MR. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 2004;109:506-512.

61. Brown BD, Shi CX, Powell S, Hurlbut D, Graham FL, Lillicrap D. Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. *Blood* 2004;103:804-810.

62. Harding TC, Koprivnikar KE, Tu GH, Zayek N, Lew S, Subramanian A, Sivakumaran A, Frey D, Ho K, VanRoey MJ, Nichols TC, Bellinger DA, Yendluri S, Waugh J, McArthur J, Veres G, Donahue BA. Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. *Gene Ther* 2004;11:204-213.

63. Bennett J. Gene therapy for Leber congenital amaurosis. *Novartis Found Symp* 2004;255:195-202.

64. Ehrhardt A, Xu H, Dillow AM, Bellinger DA, Nichols TC, Kay MA. A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia. *Blood* 2003;102:2403-2411.

65. Yanay O, Barry SC, Katen LJ, Brzezinski M, Flint LY, Christensen J, Liggitt D, Dale DC, Osborne WR. Treatment of canine cyclic neutropenia by lentivirus-mediated G-CSF delivery. *Blood* 2003;102:2046-2052.

66. Scallan CD, Lillicrap D, Jiang H, Qian X, Patarroyo-White SL, Parker AE, Liu T, Vargas J, Nagy D, Powell SK, Wright JF, Turner PV, Tinlin SJ, Webster SE, McClelland A, Couto LB. Sustained phenotypic correction of canine

hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood* 2003;102:2031-2037.

67. Xu L, Gao C, Sands MS, Cai SR, Nichols TC, Bellinger DA, Raymer RA, McCorquodale S, Ponder KP. Neonatal or hepatocyte growth factor-potentiated adult gene therapy with a retroviral vector results in therapeutic levels of canine factor IX for hemophilia B. *Blood* 2003;101:3924-3932.

68. Harvey SJ, Zheng K, Jefferson B, Moak P, Sado Y, Naito I, Ninomiya Y, Jacobs R, Thorner PS. Transfer of the alpha 5(IV) collagen chain gene to smooth muscle restores in vivo expression of the alpha 6(IV) collagen chain in a canine model of Alport syndrome. *Am J Pathol* 2003;162:873-885.

69. Chuah MK, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Johnston M, Gillijns V, Hertel S, Van Rooijen N, Lillicrap D, Collen D, VandenDriessche T, Kochanek S. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 2003;101:1734-1743.

70. Meertens L, Zhao Y, Rosic-Kablar S, Li L, Chan K, Dobson H, Gartley C, Lutzko C, Hopwood J, Kohn D, Kruth S, Hough MR, Dube ID. In utero injection of alpha-L-iduronidase-carrying retrovirus in canine mucopolysaccharidosis type I: infection of multiple tissues and neonatal gene expression. *Hum Gene Ther* 2002;13:1809-1820.

71. Ponder KP, Melniczek JR, Xu L, Weil MA, O'Malley TM, O'Donnell PA, Knox VW, Aguirre GD, Mazrier H, Ellinwood NM, Sleeper M, Maguire AM, Volk SW, Mango RL, Zweigle J, Wolfe JH, Haskins ME. Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13102-13107.

72. Beaty RM, Jackson M, Peterson D, Bird A, Brown T, Benjamin DK, Jr., Juopperi T, Kishnani P, Boney A, Chen YT, Koeberl DD. Delivery of glucose-6-phosphatase in a canine model for glycogen storage disease, type Ia, with adeno-associated virus (AAV) vectors. *Gene Ther* 2002;9:1015-1022.

73. Herzog RW, Fields PA, Arruda VR, Brubaker JO, Armstrong E, McClintock D, Bellinger DA, Couto LB, Nichols TC, High KA. Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002;13:1281-1291.
74. Xu L, Haskins ME, Melniczek JR, Gao C, Weil MA, O'Malley TM, O'Donnell PA, Mazrier H, Ellinwood NM, Zweigle J, Wolfe JH, Ponder KP. Transduction of hepatocytes after neonatal delivery of a Moloney murine leukemia virus based retroviral vector results in long-term expression of beta-glucuronidase in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Ther* 2002;5:141-153.
75. Herzog RW, Mount JD, Arruda VR, High KA, Lothrop CD, Jr. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 2001;4:192-200.
76. Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Tinlin S, Webster S, Cameron C, Hough C, Notley C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 2001;97:107-113.
77. Chao H, Samulski R, Bellinger D, Monahan P, Nichols T, Walsh C. Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines. *Gene Ther* 1999;6:1695-1704.
78. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, High KA. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999;5:56-63.
79. Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, Xiao X, Nichols TC, Bellinger DA, Read MS, Walsh CE. Direct intramuscular injection with recombinant AAV

vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther* 1998;5:40-49.

80. Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD, Jr. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 1996;88:3846-3853.

81. Shull RM, Lu X, McEntee MF, Bright RM, Pepper KA, Kohn DB. Myoblast gene therapy in canine mucopolysaccharidosis. I: Abrogation by an immune response to alpha-L-iduronidase. *Hum Gene Ther* 1996;7:1595-1603.

82. Keller ET, Burkholder JK, Shi F, Pugh TD, McCabe D, Malter JS, Macewen EG, Yang NS, Ershler WB. In vivo particle-mediated cytokine gene transfer into canine oral mucosa and epidermis. *Cancer Gene Ther* 1996;3:186-191.

83. Fang B, Eisensmith RC, Wang H, Kay MA, Cross RE, Landen CN, Gordon G, Bellinger DA, Read MS, Hu PC, . Gene therapy for hemophilia B: host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression. *Hum Gene Ther* 1995;6:1039-1044.

84. Dumey N, Mongiat-Artus P, Devauchelle P, Lesourd A, Cotard JP, Le Duc A, Marty M, Cussenot O, Cohen-Haguenaer O. In vivo retroviral mediated gene transfer into bladder urothelium results in preferential transduction of tumoral cells. *Eur Urol* 2005;47:257-263.

85. Bianco SR, Sun J, Fosmire SP, Hance K, Padilla ML, Ritt MG, Getzy DM, Duke RC, Withrow SJ, Lana S, Matthiesen DT, Dow SW, Bellgrau D, Cutter GR, Helfand SC, Modiano JF. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2003;10:726-736.

86. Thamm DH, Kurzman ID, Macewen EG, Feinmehl R, Towell TL, Longhofer SL, Johnson CM, Geoly FJ, Stinchcomb DT. Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:473-480.

87. Bainbridge JW, Mistry A, Schlichtenbrede FC, Smith A, Broderick C, De Alwis M, Georgiadis A, Taylor PM, Squires M, Sethi C, Charteris D, Thrasher AJ, Sargan D, Ali RR. Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene Ther* 2003;10:1336-1344.
88. Park HS, Cheon J, Cho HY, Ko YH, Bae JH, Moon DG, Kim JJ. In vivo characterization of a prostate-specific antigen promoter-based suicide gene therapy for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Gene Ther* 2003;10:1129-1134.
89. Cerletti M, Negri T, Cozzi F, Colpo R, Andreetta F, Croci D, Davies KE, Cornelio F, Pozza O, Karpati G, Gilbert R, Mora M. Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther* 2003;10:750-757.
90. Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB, Rosen MR. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003;107:1106-1109.
91. Izquierdo Rojo JM. [The canine model in the gene therapy of glioblastoma]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 2003;120:703-710.
92. Ahmet I, Sawa Y, Iwata K, Matsuda H. Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates cardiac remodeling in the canine heart: A novel gene therapy for cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:957-963.
93. Kalil RA, Teixeira LA, Mastalir ET, Moreno P, Fricke CH, Nardi NB. Experimental model of gene transfection in healthy canine myocardium: perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. *Arq Bras Cardiol* 2002;79:223-232.
94. Huang GM, Li GS, Zhu GY, Lai YM, Zhang HX, Wang J, Wang HR. Safety and bioactivity of intracoronary delivery of naked plasmid DNA encoding human atrial natriuretic factor. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:609-611.

95. Mount JD, Herzog RW, Tillson DM, Goodman SA, Robinson N, McClelland ML, Bellinger D, Nichols TC, Arruda VR, Lothrop CD, Jr., High KA. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 2002;99:2670-2676.
96. Khurana VG, Smith LA, Baker TA, Eguchi D, O'Brien T, Katusic ZS. Protective vasomotor effects of in vivo recombinant endothelial nitric oxide synthase gene expression in a canine model of cerebral vasospasm. *Stroke* 2002;33:782-789.
97. Weld KJ, Mayher BE, Allay JA, Cockroft JL, Reed CP, Randolph MM, Lu Y, Steiner MS, Gingrich JR. Transrectal gene therapy of the prostate in the canine model. *Cancer Gene Ther* 2002;9:189-196.
98. Andrawiss M, Maron A, Beltran W, Opolon P, Connault E, Griscelli F, Yeh P, Perricaudet M, Devauchelle P. Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *J Gene Med* 2001;3:228-239.
99. Siemens DR, Iwasawa T, Austin JC, Williams RD, See WA, Hedican SP, Tartaglia J, Flynn CM, Cohen MB, Rodgers J, Ratliff TL. Biomarker distribution after injection into the canine prostate: implications for gene therapy. *BJU Int* 2000;86:1076-1083.
100. Goomer RS, Maris TM, Gelberman R, Boyer M, Silva M, Amiel D. Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair. *Clin Orthop* 2000;S189-S200.
101. Link CJ, Jr., Seregina T, Levy JP, Martin M, Ackermann M, Moorman DW. Murine retroviral vector producer cells survival and toxicity in the dog liver. *In Vivo* 2000;14:643-649.
102. Link CJ, Jr., Moorman DW, Ackerman M, Levy JP, Seregina T. Murine retroviral vector producer cells survival and toxicity in the peritoneal cavity of dogs. *In Vivo* 2000;14:635-641.

103. Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, Wilson JM. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8 mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 2005.
104. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Hodge E, Thirumurti V, Goncalves L, Unger EF. Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1999;44:294-302.
105. Steiner MS, Zhang Y, Carraher J, Lu Y. In vivo expression of prostate-specific adenoviral vectors in a canine model. *Cancer Gene Ther* 1999;6:456-464.
106. Goto H, Shuler FD, Lamsam C, Moller HD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Transfer of lacZ marker gene to the meniscus. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:918-925.
107. Lu Y, Carraher J, Zhang Y, Armstrong J, Lerner J, Rogers WP, Steiner MS. Delivery of adenoviral vectors to the prostate for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1999;6:64-72.
108. Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999;5:64-70.
109. Andrawiss M, Opolon P, Benihoud K, Devauchelle P, Di Falco N, Villette JM, Kremer E, Saulnier P, Berthon P, Perricaudet M, Cussenot O. Adenovirus-mediated gene transfer in dog prostate: a preclinical study of a relevant model system for gene therapy of human prostatic cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999;2:25-35.

110. Labhasetwar V, Bonadio J, Goldstein S, Chen W, Levy RJ. A DNA controlled-release coating for gene transfer: transfection in skeletal and cardiac muscle. *J Pharm Sci* 1998;87:1347-1350.
111. Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C, Potter TA. In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J Clin Invest* 1998;101:2406-2414.
112. Chauvet AE, Kesava PP, Goh CS, Badie B. Selective intraarterial gene delivery into a canine meningioma. *J Neurosurg* 1998;88:870-873.
113. Howell JM, Fletcher S, O'Hara A, Johnsen RD, Lloyd F, Kakulas BA. Direct dystrophin and reporter gene transfer into dog muscle in vivo. *Muscle Nerve* 1998;21:159-165.
114. Foley R, Ellis R, Walker I, Wan Y, Carter R, Boyle M, Braciak T, Addison C, Graham F, Gauldie J. Intramarrow cytokine gene transfer by adenoviral vectors in dogs. *Hum Gene Ther* 1997;8:545-553.
115. Kay MA, Landen CN, Rothenberg SR, Taylor LA, Leland F, Wiehle S, Fang B, Bellinger D, Finegold M, Thompson AR, . In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2353-2357.
116. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN, Bellinger DA, Leland F, Toman C, Finegold M, Thompson AR, Read MS, Brinkhous KM, . In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 1993;262:117-119.
117. Lim CS, Chapman GD, Gammon RS, Muhlestein JB, Bauman RP, Stack RS, Swain JL. Direct in vivo gene transfer into the coronary and peripheral vasculatures of the intact dog. *Circulation* 1991;83:2007-2011.

118. Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, Anson DS. Evaluation of fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:284-296.
119. Simonaro CM, Haskins ME, Abkowitz JL, Brooks DA, Hopwood JJ, Zhang J, Schuchman EH. Autologous transplantation of retrovirally transduced bone marrow or neonatal blood cells into cats can lead to long-term engraftment in the absence of myeloablation. *Gene Ther* 1999;6:107-113.
120. Walkley SU, Thrall MA, Dobrenis K, Huang M, March PA, Siegel DA, Wurzelmann S. Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2970-2974.
121. Lothrop CD, Jr., al Lebban ZS, Niemeyer GP, Jones JB, Peterson MG, Smith JR, Baker HJ, Morgan RA, Eglitis MA, Anderson WF. Expression of a foreign gene in cats reconstituted with retroviral vector infected autologous bone marrow. *Blood* 1991;78:237-245.
122. al Lebban ZS, Henry JM, Jones JB, Eglitis MA, Anderson WF, Lothrop CD, Jr. Increased efficiency of gene transfer with retroviral vectors in neonatal hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1990;18:180-184.
123. Walker MC, Mandell TC, Crawford PC, Simon GG, Cahill KS, Fernandes PJ, MacLeod JN, Byrne BJ, Levy JK. Expression of erythropoietin in cats treated with a recombinant adeno-associated viral vector. *Am J Vet Res* 2005;66:450-456.
124. Beall CJ, Phipps AJ, Mathes LE, Stromberg P, Johnson PR. Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 2000;7:534-539.
125. Liu G, Ashbourne Excoffon KJ, Wilson JE, McManus BM, Rogers QR, Miao L, Kastelein JJ, Lewis ME, Hayden MR. Phenotypic correction of feline

lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 2000;11:21-32.

126. Yogalingam G, Muller V, Hopwood JJ, Anson DS. Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus-transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells. *DNA Cell Biol* 1999;18:187-195.

127. Vite CH, McGowan JC, Niogi SN, Passini MA, Drobotz KJ, Haskins ME, Wolfe JH. Effective gene therapy for an inherited CNS disease in a large animal model. *Ann Neurol* 2005;57:355-364.

128. Loewen N, Fautsch MP, Teo WL, Bahler CK, Johnson DH, Poeschla EM. Long-term, targeted genetic modification of the aqueous humor outflow tract coupled with noninvasive imaging of gene expression in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3091-3098.

129. Ho TT, Maguire AM, Aguirre GD, Surace EM, Anand V, Zeng Y, Salvetti A, Hopwood JJ, Haskins ME, Bennett J. Phenotypic rescue after adeno-associated virus-mediated delivery of 4-sulfatase to the retinal pigment epithelium of feline mucopolysaccharidosis VI. *J Gene Med* 2002;4:613-621.

130. Rochlitz CF, Jantscheff P, Bongartz G, Dietrich PY, Quiquerez AL, Schatz C, Mehtali M, Courtney M, Tartour E, Dorval T, Fridman WH, Herrmann R. Gene therapy with cytokine-transfected xenogeneic cells in metastatic tumors. *Adv Exp Med Biol* 1998;451:531-537.

131. Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996;3:1104-1112.

132. Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994;5:1477-1483.

133. Allen C, McDonald C, Giannini C, Peng KW, Rosales G, Russell SJ, Galanis E. Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas. *J Gene Med* 2004;6:1216-1227.
134. Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 2004;2:9.
135. Blechacz B, Russell SJ. Parvovirus vectors: use and optimisation in cancer gene therapy. *Expert Rev Mol Med* 2004;6:1-24.
136. Duan YY, Wu J, Zhu JL, Liu SL, Ozaki I, Strayer DS, Zern MA. Gene therapy for human alpha1-antitrypsin deficiency in an animal model using SV40-derived vectors. *Gastroenterology* 2004;127:1222-1232.
137. Jia W, Zhou Q. Viral vectors for cancer gene therapy: viral dissemination and tumor targeting. *Curr Gene Ther* 2005;5:133-142.
138. Klink D, Schindelhauer D, Laner A, Tucker T, Bebok Z, Schwiebert EM, Boyd AC, Scholte BJ. Gene delivery systems--gene therapy vectors for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3 Suppl 2:203-212.
139. Lundstrom K. Gene therapy applications of viral vectors. *Technol Cancer Res Treat* 2004;3:467-477.
140. Montier T, Delepine P, Pichon C, Ferec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol* 2004;22:586-592.
141. Agarwal A, Unfer R, Mallapragada SK. Novel cationic pentablock copolymers as non-viral vectors for gene therapy. *J Control Release* 2005;103:245-258.

142. Strayer DS. Viral vectors for gene therapy: Past, present and future. Drug News Perspect 1998;11:277-286.

143. Lundstrom K. Gene therapy applications of viral vectors. Technol Cancer Res Treat 2004;3:467-477.

144. Jia W, Zhou Q. Viral vectors for cancer gene therapy: viral dissemination and tumor targeting. Curr Gene Ther 2005;5:133-142.

145. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. Nature 2005;433:561.

4.2 TERAPIA DEL LINFOSARCOMA

El tratamiento de linfoma (LSA) en humanos y perros se ha basado de manera predominante en la quimioterapia convencional y la radioterapia (Mayer and Larue, 2005; Weiden et al., 1979; Williams et al., 2004). A pesar de haber mejorado mucho la tasa de respuesta y supervivencia con esas terapias, un número significativo de pacientes no responden o tienen recaídas. Además, la quimioterapia convencional frecuentemente se asocia con morbilidad, toxicidad (Kisseberth and MacEwen, 2001) y quimioresistencia (Frimberger et al., 2006; Laing et al., 1989; Lee et al., 1996; Moore et al., 1995). En la última década se han tenido grandes avances en la terapia anticancerosa con la introducción de nuevas terapias biotecnológicas. Esas terapias dirigidas a un tejido blanco son dominadas ahora por anticuerpos monoclonales, los cuales representan agentes terapéuticos importantes para varios tipos de cáncer incluyendo el linfoma no Hodgkin (LNH) (Impellizeri et al., 2006; Multani et al., 2001). Los vectores virales han sido frecuentemente aplicados en terapia somática con el objetivo de tratar varias enfermedades genéticas en las áreas de la neurología, enfermedades metabólicas, hemostasia y cáncer. Los virus que han sido modificados para emplearlos como vectores son: los adenovirus, virus adeno-asociados, alfavirus, herpes virus simple, lentivirus y retrovirus (Lundstrom, 2004). Uno de los desafíos en el desarrollo de vectores para la terapia génica es la especificidad celular, con el objetivo de que estas células blanco afectadas tengan suficiente expresión del gen terapéutico, mientras que por otro lado, se minimice la expresión y la toxicidad en los tejidos sanos. El vector adenoviral humano serotipo 5 del subgrupo C (Ad5) es el más empleado en terapia génica somática por conocerse su estructura y biología, además puede ser fácilmente modificado. Actualmente, se pueden producir con relativa facilidad grandes cantidades de Ad5 recombinantes sin modificar su capacidad de infectar células blanco. Estos vectores no son oncogénicos en humanos (Hackett and Crystal, 2000) y continúan siendo una herramienta atractiva para la terapia génica porque no integran su genoma a las células infectadas e infectan células en mitosis o que no están en división celular (Ehrhardt et al., 2003). El perro puede emplearse como modelo de muchas enfermedades de

humanos y varios tipos terapia génica, tales son los casos de hemofilia A (Manno et al., 2006; Zhang et al., 1999), hemofilia B (Herzog et al., 1999), melanomas (Andrawiss et al., 2001); cáncer de próstata (Barton et al., 2003), cáncer gástrico (Matsukura et al., 1999), factores de crecimiento hematopoyético (Foley et al., 1997), lesiones en la porción avascular del menisco (Goto et al., 1999), actividad de marcapasos cardíaco biológico (Plotnikov et al., 2004), diabetes mellitus canino (Ayuso et al., 2006), vasoespasmos cerebrales (Khurana et al., 2002), distrofia muscular canina (Cerletti et al., 2003) y degeneración de la retina hereditaria (Acland et al., 2001) en los que ya se han hecho ensayos clínicos.

Existe consenso en que la toxicidad es dependiente de la dosis cuando la administración de los vectores adenovirales se efectúa por vía sistémica, éste presenta un particular riesgo de hepatotoxicidad. Los vectores que pueden infectar al tejido específico mediante la administración sistémica o poco invasiva, pueden incrementar su potencial terapéutico y ampliar su aplicación (O'Riordan et al., 2003). El LSA es la neoplasia hematológica maligna más frecuente en el perro y en su forma multicéntrica es la más común, afectando linfonodos, hígado, bazo, sangre y médula ósea en diferentes grados similares a los humanos (Vonderhaar and Morrison, 1998). Un hecho importante en los ensayos clínicos es la valoración de la seguridad del fármaco administrado, efectuando un seguimiento para determinar la posibilidad de lesión tisular relacionada por el fármaco. Para ello se lleva a cabo la evaluación de eventos adversos (EA), éstos son considerados cualquier signo desfavorable e inesperado que incluye valores de laboratorio fuera de rango, signos o hallazgos asociados temporalmente al empleo de tratamientos o procedimientos médicos. Un EA es un término empleado en la documentación médica y en análisis científicos de desarrollo de fármacos (National Cancer Institute, 2003). Existen algunas recomendaciones parciales, órgano-específicas como las propuestas por el Comité de Regulación de Asuntos de la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria para la selección e interpretación de resultados de analitos hepato-específicos para la identificación y la evaluación rigurosa constante de fármacos y su potencial

para inducir lesiones hepáticas en los animales y en los humanos (Boone et al., 2005) o con empleo de unidades antiguas o con criterios más generales y terminología para determinar los EA como los propuestos por el Grupo Veterinario Cooperativo (Veterinary co-operative oncology group—common terminology criteria for adverse events, 2004).

5.- JUSTIFICACIÓN

- En la búsqueda de la literatura con cualquier tipo de terapia, no se ha descrito la vía intralinfonodal (ILN).
- La gran mayoría de estudios en cáncer se realiza en neoplasias experimentales, pocos estudios en neoplasias espontáneas.
- Se tiene un cuadro extenso de eventos adversos en humanos y se requiere diseñar uno para perros exclusivamente y bajo nuestras condiciones.
- Marcar el inicio de este tipo de estudios en Medicina Veterinaria en México.
- Se requieren modelos con patologías similares al humano, el perro es un modelo intermedio entre ratón y humano y en aquel el linfosarcoma cursa de similar manera.

6. HIPÓTESIS

“Los adenovirus son potenciales vectores para el tratamiento génico de linfoma en perros por su seguridad y distribución al administrarse por vía intralinfonodal”

7. OBJETIVO

“Determinar la seguridad y distribución de un vector adenoviral por administración intralinfonodal en perros con linfoma multicéntrico espontáneo”

7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir la dosis tóxica limitante.
2. Determinar eventos adversos por administración de adenovirus.
3. Establecer la distribución del vector adenoviral.
4. Establecer un sistema de seguimiento clínico y de laboratorio en animales bajo terapia experimental.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue llevado a cabo en el Hospital de Especialidades en Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Nacional de Rehabilitación y el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria Experto en la ciudad de México. Los perros fueron seleccionados de la casuística diaria del laboratorio y donados amparado con una carta de donación (anexo 1) y fueron evaluados antes y durante el ensayo a las 12, 24, 48 y 72 h posteriores a la administración del vector adenoviral por vía ILN en D-MEM/F-12 como vehículo (11039-021 GIBCO™ Invitrogen Co. USA). La evaluación se realizó a través de EA clínicos y laboratoriales.

Animales

Se emplearon 6 perros adultos (un macho y 5 hembras) con diagnóstico de linfosarcoma multicéntrico espontáneo, seleccionados de la casuística cotidiana del laboratorio Experto fueron alojados en jaulas metálicas individuales durante este estudio. Los perros se mantuvieron en ayuno durante 12 horas y 4 horas sin agua antes de cada muestreo.

Diagnóstico de linfosarcoma

Todos los casos considerados debieron tener varios criterios de diagnóstico en diferentes evaluaciones para ubicarlos como linfosarcoma multicéntrico estadio clínico IIIa al Vb según la OMS (Vail et al., 2001):

- Examen clínico. Linfadenomegalia generalizada con o sin signos clínicos secundarios como mucosas pálidas, pérdida de peso, anorexia, depresión, hifema u opacidad ocular, esplenomegalia, edema, etc.
- Examen radiológico. Masa mediastínica, desviación dorsal de la tráquea, desviación ventral de colon, aire en asas intestinales, hepato-esplenomegalia, etc.
- Examen hematológico. Anemia, hipoproteinemia, linfocitos maduros o inmaduros anormales, cuerpos linfoglandulares en circulación, trombocitopenia, etc.

- Examen citológico. Monotonía celular, predominio de linfoblastos, predominio de prolinfocitos, mitosis anormales, índice mitótico mayor a 1/campo/400x.

Adenovirus

El vector empleado fue un adenovirus (Ad5) recombinante no replicativo (con eliminación de las regiones E1 y E3) con la inserción del gen reportero *lacZ* de *E. coli* (proporcionado por el Dr. Curiel, del Centro de Terapia Génica de la Universidad de Alabama), que expresa la enzima beta-galactosidasa (Ad5 β -gal) el cual fue amplificado mediante la infección de la línea celular HEK 293 (células renales de embrión humano, ATTC CRL-1573 EUA).

Amplificación

Se preparó un cultivo de células HEK 293 en frascos T75 (Sarsted Alemania) en el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM F/12 mix) (Gibco Invitrogen Co. EUA) con suero fetal bovino (SFB) (Gibco Invitrogen Co. EUA) al 10% y una vez que éstas presentaron una confluencia del 70 al 80% se consideraron listas para la infección con el Ad5 β -gal.

El cultivo se infectó con 10 unidades formadoras de placa (UFP). En un frasco T75 se prepararon 3 mL de medio OptiMEM (Gibco Invitrogen Co. EUA) con la cantidad de virus requerida en suspensión. Se eliminó todo el medio de la caja y se adicionaron los 3 mL del medio infectante. Se incubaron en frascos de polipropileno con tapa y filtro a 37°C con 5% de CO₂ y 85% de humedad (NuAire EUA) por 12 h, se eliminó el medio infectante y se adicionaron 10 mL de D-MEM F/12 mix con 10% de SFB; se regresaron las cajas a incubación por otras 12 h y se observaron para verificar la presencia de efecto citopático en donde el núcleo ocupa la mayor parte de la célula, ésta se redondea como resultado de la producción de virus (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Application Manual. Version 1.2. Montreal, Qc. Canada). Se observaron los cultivos cada 2 h después de 30 h post-infección hasta observación del efecto citopático en el 30% de las células. Se recolectaron las células infectadas a las 40 h mediante ligeros golpes en la parte lateral de la caja para separación de las células adheridas y la decantación de la suspensión de células. Se mantuvieron las células a 4°C, se centrifugaron a

600 x g durante 5 min a 4°C, se retiraron 5 mL de sobrenadante y se almacenó en un tubo estéril para su posterior uso, se resuspendieron las células en el sobrenadante restante. Se congeló a -70°C, posteriormente se procesó esta suspensión por medio de 3 ciclos de 2 min de congelación-descongelación, mediante el uso de un baño maría a 37°C y un baño de etanol/hielo seco, después de cada descongelación se homogenizó la suspensión celular utilizando un vórtex. Después del tercer ciclo, se centrifugó a 1500 x g, durante 5 min, para la separación de los fragmentos celulares. Se desechó el botón celular y se colectó el sobrenadante en un tubo estéril y se juntó al sobrenadante almacenado en pasos anteriores para aforar a un volumen de 10 mL y se filtró a través una membrana de 0.45 micrómetros (Stericup Millipore EUA). Posteriormente se colectó el filtrado en una botella estéril. Ese filtrado se empleó para infectar 3 frascos T75 con células HEK 293 a confluencia del 80 al 90% y se repitieron los pasos anteriores hasta lograr 45 frascos. Del filtrado de esas cajas se efectuó la purificación del virus y su titulación (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Application Manual. Version 1.2).

Purificación del adenovirus

A partir del filtrado obtenido, se eliminaron los restos de ADN agregando benzonasa que es una ADNasa (Novagen EMD Chemicals Inc. Alemania) en proporción de 10 U/mL, se incubó 30 min a 37°C, para eliminar la viscosidad de la mezcla y un paso fluido por la columna de purificación, así como una mejor lectura por densidad óptica para la titulación de los virus. La columna de purificación tiene una membrana que selecciona específicamente las partículas adenovirales por sus propiedades fisicoquímicas, las adsorbe capturándolas. Esta membrana se encuentra dentro de un cartucho pequeño por donde se hizo pasar el filtrado del lisado celular por acción de un vacío generado por una jeringa y posteriormente por elusión de la membrana se despegaron las partículas adenovirales purificadas según las indicaciones del fabricante (Kit de purificación de Virus BD Adeno-X™ Becton, Dickinson and Co. - Biosciences, EUA).

El virus purificado se colectó en un tubo para concentración de adenovirus (Centricon YM-50, Millipore Corporation EUA), el cual se centrifugó hasta que

fue reducido a 1 mL. Este concentrado se mezcló con 2 mL de amortiguador para criopreservación.

Titulación del adenovirus

El método empleado se basó en la densidad óptica (DO_{260}) de las partículas en solución que corresponden al contenido de ADN. El coeficiente de extinción es de 1.1×10^{12} virus por unidad DO_{260} . Se emplearon diluciones adenovirales de 1:2, 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50 con la solución amortiguadora de lisis viral (SALV) (0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA) bajo condiciones estériles de campana de flujo laminar y se incubaron a 56°C sobre un mezclador durante 10 min. Se determinó la DO_{260} de la solución blanco que consiste en la SALV mezclada con una solución amortiguadora de diálisis en lugar de la preparación adenoviral y se hicieron lecturas en cuádruple de cada dilución para obtener el promedio y lectura de la concentración final.

Posteriormente se realizaron alícuotas del concentrado adenoviral y se almacenaron a -70 °C para su posterior uso.

Prueba de infectividad del adenovirus

Antes de la administración ILN del Ad5 β -gal, se efectuó la prueba de infectividad en un cultivo de la línea celular HeLa de cáncer cervical humano (VCA-1001, Amaxa, Inc. USA), mediante la detección de β -galactosidasa. Se empleó el sustrato cromogénico X-gal a 37 °C según las directivas del fabricante (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Application Manual. Version 1.2. Montreal, Qc. Canada).

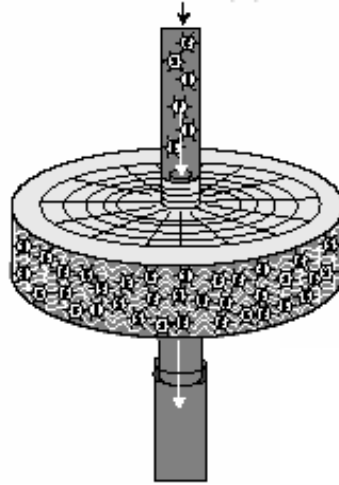


Figura 1. Columna para purificación de adenovirus (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Application Manual. Version 1.2).

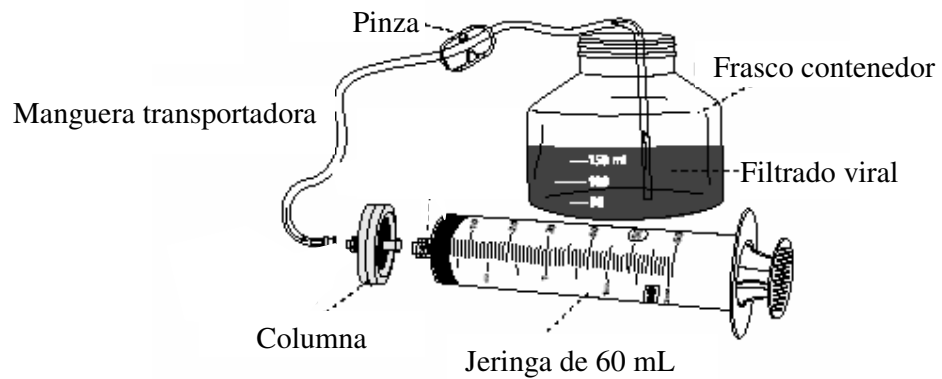


Figura 2. Sistema de purificación de adenovirus con la columna acoplada a una jeringa y a un frasco contenedor (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Application Manual. Version 1.2).

Evaluación de eventos adversos

Para la evaluación de EA debidos a la administración del Ad5 β -gal se tomaron en consideración a varios elementos selectos de los signos clínicos, mientras que dentro del panel de patología clínica completo se consideró al hemograma, perfil bioquímico y urianálisis.

Signos clínicos

Los signos clínicos que se incluyeron en este estudio durante el examen físico fueron la anorexia, temperatura, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, vómito, deshidratación, diarrea y edema. Los perros fueron observados cada 2 horas durante el estudio (anexo 2).

Patología clínica

Un perfil completo de patología clínica fue establecido para evaluar los EA, en donde se incluyó la evaluación del hemograma completo con hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, volumen globular medio (VGM), concentración globular media de hemoglobina (CGMH), reticulocitos, eritrocitos nucleados, morfología eritrocítica anormal, leucocitos, neutrófilos maduros, neutrófilos inmaduros, linfocitos, monocitos, eosinófilos, plaquetas, sólidos totales y fibrinógeno.

Se establecieron perfiles de evaluación renal, hepático, pancreático, muscular, cardiaco, de equilibrio ácido base y de integridad celular general según los empleados en nuestra casuística de rutina (cuadro 7) (Latimer et al., 2003).

Diseño experimental

Se evaluaron 6 perros con dosis escalada de Ad5 β -gal administradas por vía ILN (cuadro 8), una dosis por perro dividida en cuatro para aplicación de los cuadrantes seleccionados (linfonodos cervicales superficiales derecho e izquierdo y en linfonodos poplíteos derecho e izquierdo) según la guía de EA en perros empleada en el laboratorio Experto desde el año 2003 (cuadros 9 - 14) adaptados, complementados y modificados con el sistema internacional de unidades a partir de la versión 3.0 2003 del National Cancer Institute NCI CTEP.

El grado de atribución de EA fue aplicado según el cuadro 13 al cual se sustrajo el valor de ajuste del cuadro 14 con la finalidad de otorgar un grado

real de EA y así distinguir de manera segura los eventos relacionados en este caso, al linfoma mismo de aquellos resultantes de la administración del Ad5 β -gal.

Cuadro 7. Analitos selectos para la evaluación de eventos adversos en hígado, riñón, páncreas, músculo, corazón e integridad celular general y del equilibrio ácido base

Órgano/Tejido	Analitos
Hígado	Glucosa, urea, colesterol, triglicéridos, bilirrubina total, bilirrubina conjugada y no conjugada, proteínas totales, albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotrasferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), gama glutamil trasferasa (GGT) y lactato deshidrogenasa láctica total (LDH).
Riñones	Urea, creatinina, albúmina, calcio, fósforo inorgánico, potasio y LDH.
Páncreas	Glucosa, FA, GGT y amilasa.
Músculo corazón e integridad celular general	estriado, CK, AST y LDH.
Equilibrio ácido base	K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , diferencia de iones fuertes clínica (DIF_{clin}) y ácidos no volátiles (ANV).

Cuadro 8. Diseño experimental en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo

Perro nº	Dosis de Ad5β-gal por vía ILN	Evaluación de eventos adversos
1	DMEM/F-12 estéril (vehículo)	Antes (0) 12 24 48 72 h
2	1.35 X 10 ¹⁰ /PV/kg	Antes (0) 12 24 48 72 h
3	2.53 X 10 ¹⁰ / PV/kg	Antes (0) 12 24 48 72 h
4	6.10 X 10 ¹⁰ / PV/kg	Antes (0) 12 24 48 72 h
5	18.38 X 10 ¹⁰ / PV/kg	Antes (0) 12 24 48 72 h
6	153.85 X 10 ¹⁰ / PV/kg	Antes (0) 12 24 48 72 h

ILN.- Intralinfonodal

PV/kg.- Partículas virales por kilogramo de peso

Cuadro 9. Guía de grados de eventos adversos clínicos en perros

Evento adverso	0	1	2	3	4
Anorexia	Sin cambios	< 1 día	1-3 días	4-5 días	>5 días
Temperatura (°C)	38-39	39.1-39.5	39.6-40.0	40.1-40.5	>40.5
Frecuencia cardiaca adultos (min)	70-120	121-140	141-160	161-180	>180
Frecuencia respiratoria	11-30	31-40	41-50	51-60	>60
Vómito	ausente	náusea	esporádico	< 5/día, <2 días	>5/día, >2 días
Deshidratación	ausente	5%	8%	10%	>10%
Diarrea	ausente	Heces blandas	<4/día <2 días	4-7/día o >2 días	>7/día o con sangre
Edema	ausente	ligera	moderada	elevada	severa extremidades y facial

Cuadro 10. Guía de grados de eventos adversos hematológicos en perros

Evento adverso	0	1	2	3	4
Hematocrito (L/L)	0.37-0.55	0.30-0.36	0.22-0.29	0.15-0.21	<0.15
Hemoglobina (g/L)	120-180	97-119	74-96	50-73	<50
Eritrocitos (X10 ¹² /L)	5.5-8.5	4.5-5.49	3.5-4.49	2.5-3.49	<2.5
Plaquetas (X10 ⁹ /L) Bajo	200-600	100-199	50-99	20-49	<20
Plaquetas (X10 ⁹ /L) Alto		601-800	801-1000	1001-1200	>1200
Leucocitos (X 10 ⁹ /L) Bajo	6.0-17.0	5.0-5.9	4.0-4.9	3.0-3.9	<3.0
Leucocitos (X 10 ⁹ /L) Alto		17.1-30.0	30.1-40.0	40.1-50.0	>50
Neutrófilos (X 10 ⁹ /L) Bajo	3.0-11.5	1.5-3.0	1.0-1.4	0.5-0.9	<0.5
Neutrófilos (X 10 ⁹ /L) Alto		11.6-20.0	20.1-30.0	30.1-40.0	>40.0
Neutrófilos banda (X 10 ⁹ /L)	0.0-0.3	0.4-0.8	0.9-1.8	1.9-3.8	>3.8
Linfocitos (X 10 ⁹ /L)	1.0-4.8	0.9-0.7	0.6-0.4	0.3-0.1	0.0
Monocitos (X 10 ⁹ /L)	0-1.4	1.5-2.0	2.1-2.5	2.6-3.0	>3.0
Eosinófilos (X 10 ⁹ /L)	0-0.9	1-1.5	1.6-2.0	2.1-2.5	>2.5
Sólidos totales (g/L)	60-75	55-59	50-54	45-49	<45
Metarrubricitos/100 leucocitos	Negativo	1-2	3-5	6-10	>10
Fibrinógeno (g/L)	1-2	2.1-3.0	3.1-4.0	4.1-5.0	>5.0

Bajo.- Eventos adversos en valores bajos

Alto.- Eventos adversos en valores altos

Cuadro 11. Guía de grados de eventos adversos bioquímicos en perros

Evento adverso		0	1	2	3	4
Glucosa (mmol/L)		3.38-6.88	3.00-3.37	2.50-2.99	2.0-2.49	<2.0
Urea (mmol/L)	Bajo	2.09-7.91	1.7-2.08	1.3-1.69	1.00-1.29	<1.00
Urea (mmol/L)	Alto		7.92-8.50	8.51-9.50	9.51-10.50	>10.5
Creatinina (μmol/L)		<126	133-265	266-354	355-442	>442 o > 28 d
Bilirrubina total (μmol/L)		<5.16	5.16-15.0	15.1-25.0	25.1-35.0	>35.0
Bil. conjugada (μmol/L)		<5.1	5.1-10.0	10.1-15.0	15.1-20	>20.0
Bil. (no conjugada) (μmol/L)		<1.0	1-5	5.1-10.0	10.1-15.0	>15.0
Colesterol (mmol/L)	Bajo	2.85-7.76	2.35-2.84	1.85-2.34	1.35-1.84	<1.35
Colesterol (mmol/L)	Alto		7.77-9.77	9.78-10.76	10.77-11.76	>11.76
Triglicéridos (mmol/L)		0.57-1.14	1.15-2.28	2.29-5.70	5.71-11.4	>11.4
ALT (UI/L)		<70	70-140	141-280	281-420	>420
AST (UI/L)		<55	56-110	111-220	221-330	>330
FA (UI/L)		<190	190-473	474-945	946-3780	>3780
GGT (UI/L)		<7	7-15	16-30	31-45	>45
CK (UI/L)		<213	213-532	533-1065	1066-2130	>2130
Amilasa (UI/L)		<1100	1101-1650	1651-2200	2201-5500	>5500
LDH (UI/L)		<150	150-250	251-350	351-450	>450
Proteínas totales (g/L)		56.6-74.8	53.6-56.5	51.6-53.5	49.6-51.5	<49.6
Albúmina (g/L)		29.1-39.7	25.0-29.0	20.0-24.9	15.0-19.9	<15.0
Globulinas (g/L)	Bajo	23.5-39.1	21.5-23.4	19.5-21.4	17.5-19.4	<17.5
Globulinas (g/L)	Alto		39.2-42.0	42.1-44.0	44.1-46.0	>46.0
A/G		0.78-1.46	0.70-0.77	0.60-0.69	0.50-0.59	<0.50
Calcio (mmol/L)	Bajo	2.27-2.91	2.01-2.26	1.75-2.00	1.50-1.74	<1.50
Calcio (mmol/L)	Alto		2.92-3.12	3-13-3.32	3.33-3.42	>3.42
Fósforo I. (mmol/L)	Bajo	0.75-1.70	0.65-0.74	0.55-0.64	0.45-0.54	<0.54
Fósforo I. (mmol/L)	Alto		1.71-3.00	3.10-4.50	4.51-6.00	>6.00
Potasio (mmol/L)	Bajo	3.82-5.34	3.32-3.81	2.82-3.31	2.32-2.81	<2.32
Potasio (mmol/L)	Alto		5.35-6.00	6.01-6.66	6.67-7.32	>7.32
Sodio (mmol/L)	Bajo	141-153	135-140	130-134	125-129	<125
Sodio (mmol/L)	Alto		154-158	159-163	164-168	>168
Cloro (mmol/L)	Bajo	108.0-117.0	103.0-107.9	98.0-102.9	93.0-97.9	<93.0
Cloro (mmol/L)	Alto		117.1-122.0	122.1-127	127.1-132.0	>132
Bicarbonato (mmol/L)		17.0-25.0	14.0-16.9	11.0-13.9	8.0-10.9	<8.0
Ácidos no volátiles (mmol/L)		12-24	25-27	28-31	32-35	>35
DIF _{clin} (mmol/L)	Bajo	30.0-40.0	25.0-29.9	20.0-24.9	15.0-19.9	<15.0
DIF _{clin} (mmol/L)	Alto		40.1-45.0	45.1-55.0	55.1-65.0	>65.0

Bajo.- Eventos adversos en valores bajos

Alto.- Eventos adversos en valores altos

Bil.- Bilirrubina, ALT- Alanina aminotransferasa, AST- aspartato aminotransferasa, FA- fosfatasa alcalina, GGT- gama glutamiltransferasa, CK- creatina cinasa, LDH- lactato deshidrogenasa total, A/G- relación albúmina/globulinas, fósforo I.- fósforo inorgánico, DIF_{clin}- Diferencia clínica de iones fuertes.

Cuadro 12. Guía de grados de eventos adversos del urianálisis en perros

Evento adverso	0	1	2	3	4
Proteinuria (g/L)	Negativo	0.1-0.3	0.4-1.0	2.0-5.0	>5.0
Glucosuria (mmol/L)	Negativo	0.1-2.7	2.8-5.55	5.6-16.7	16.7-55.0
Bilirrubinuria ($\mu\text{mol/L}$)	Negativo	0.1-8.55	8.56-17.1	17.2-34.2	>34.2
Hematuria (eritrocitos/campo/400x)	Negativo	5-10	11-50	51-250	>250
Cilindruria (campo/100x)	Negativo	0-1	0-2	1-2	>2
Células renales (campo/400x)	Negativo	0-1	0-2	1-2	>2

Cuadro 13. Escala de grados para la atribución de eventos adversos en perros

	No relacionado	Improbable	Posible	Probable	Definido
Grados	0	1	2	3	4
Definición	No hay eventos adversos o resultados dentro de los valores de referencia	Eventos adversos ligeros	Eventos adversos moderados	Eventos adversos indeseables severos	Evento adverso discapacitante o de amenaza a la vida

Cuadro 14. Valores de ajuste para la atribución de grados de eventos adversos en perros

Valor de ajuste	4	3	2	1	0
Definición	El evento adverso está claramente no relacionado al agente motivo de la investigación.	El evento adverso está dudosamente relacionado al agente motivo de la investigación.	El evento adverso puede estar relacionado al agente motivo de la investigación.	El evento adverso está probablemente relacionado al agente motivo de la investigación.	El evento adverso está claramente relacionado al agente motivo de la investigación.

Dosis tóxica limitante

La dosis tóxica limitante (DTL) se definió como aquella que produce EA clínicos o de laboratorio de grado 3 o superior. La dosis máxima tolerada no se determinó porque en este estudio solamente se administró una sola dosis.

Análisis de laboratorio

La evaluación del hemograma (16 analitos) y del perfil bioquímico (27 analitos) se efectuó en muestras sanguíneas colectadas de la vena cefálica. El hemograma se realizó en un contador de células Coulter Counter® T-540 (Coulter Electronics, Inc. Florida, USA). Los analitos bioquímicos fueron determinados en un espectrofotómetro Cobas Mira® Chemistry Analyzer (Roche Diagnostic Systems, Inc. New Jersey, USA), los electrólitos se determinaron por electrodo ión selectivo en un EasyLyte Plus Na⁺/K⁺/Cl⁻ (Medica Corporation MA USA). Las muestras de orina fueron obtenidas por micción espontánea y evaluadas (6 analitos) con tiras reactivas Combur¹⁰-Test® M (Roche, Germany).

Análisis de resultados

Los resultados fueron clasificados de acuerdo a la guía de EA (cuadros 9-12) y los grados de atribución y ajustados de EA (cuadros 13-14).

Los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva y la prueba de t de student pareada de dos colas (SPSS) para comparar los resultados antes y después de la administración de Ad5β-gal en perros con LSA. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Para la obtención de los perros afectados de linfosarcoma multicéntrico espontáneo se evaluaron 256 perros con linfadenomegalia de los cuales se seleccionaron 21 citológicamente según el cuadro 15.

Ninguno de los perros que recibieron Ad5 β -gal en cualquiera de las dosis, murió durante el transcurso del estudio.

En ninguno de los perros se pudo determinar la DTL.

Evaluación de los EA clínicos

Todas las dosis de Ad5 β -gal fueron bien toleradas, no se observaron EA significativos relacionados con la administración del vector (cuadro 16).

La anorexia fue de grado 2 a 0 a las 24 h posteriores a la administración ILN de Ad5 β -gal, como evento favorable. Los perros que recibieron las dosis mayores (18.38×10^{10} /VP/kg and 153.85×10^{10} /VP/kg) presentaron un vómito ligero durante las primeras 12 h después de la administración adenoviral. La frecuencia cardíaca fue elevada durante todo el desarrollo del estudio. La frecuencia respiratoria fue diferente estadísticamente en el período 12-24 h pero no fue dependiente de la dosis. Cuatro perros presentaron edema mandibular o de las extremidades desde antes de la administración adenoviral, por lo tanto, no son secundarias al vector adenoviral. La diarrea y la fiebre fueron eventos definitivamente relacionados a la enfermedad.

Evaluación de los EA hematológicos

Se presentó una disminución gradual del hematocrito en el período comprendido entre 0 y 72 h, dos perros manifestaron anemia, uno desde 0 h y otro a las 72 h. En dos perros se presentó leucocitosis y neutrofilia durante los cinco momentos de muestreo, el perro con la más alta dosis solamente presentó leucocitosis y neutrofilia a las 12 h. La disminución progresiva de sólidos totales fue estadísticamente significativa entre los muestreos 12-24 h y 12-24 h (cuadro 17).

Cuadro 15. Captación de casos con linfosarcoma en perros (05/2004 al 01/2006)

Nº de linfonodos evaluados	DIAGNÓSTICO	Seguimiento de casos con criterios completos	Nº de casos captados
256	<ul style="list-style-type: none"> • 2 con LSA leucémico • 35 con 1 hasta 3 linfonodos afectados • 43 con criterios completos • 5 en estadio final • 13 linfadenitis supurativa • 2 linfadenitis alérgica • 3 metástasis otras neoplasias • 132 hiperplasia linfo/plasmocítica • 4 sin diagnóstico • 17 grasa perilinfonodal 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 casos sin regreso del propietario • 6 sin aceptación del propietario • 4 sin aceptación del veterinario • 8 con aceptación de donación* • 6 bajo quimioterapia • 11 Sacrificio • 3 Indecisión 	6**

* 2 perros fueron sacrificados por agresividad y no por decisión del propietario.

** 5 hembras y un macho, de 2, 3, 4, 5, 7 y 8 años; de razas Labrador, Basset hound, Poodle y 2 mestizas, así como un Bulldog. La clasificación del tipo de linfosarcoma fue difuso en 5 perros y folicular en una hembra.

Cuadro 16. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos clínicos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado

Tiempo (h)	0		12		24		48		72	
	X (± de)	EA	X (± de)	EA	X (± de)	EA	X (± de)	EA	X (± de)	EA
Anorexia	2	2	1	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Temperatura (°C)	39.26 (0.87)	1	39.04 (0.54)	0	38.84 (0.39)	0	39.04 (0.54)	0	38.82 (0.49)	0
F. Cardíaca (min)	132.6 (16.55)	1	126.0 (15.17)	1	120.0 (12.84)	0	137 (9.34)	1	136.0 (22.63)	1
F. Respiratoria (min) ⁵	46.0 (19.29)	1	39.6 (17.17)	0	44.8 (14.53)	0	44.8 (19.63)	0	45.2 (15.59)	0
Vómito	Negativo	0	1	1	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Deshidratación	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Diarrea	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Edema	2	2	2	0	2	0	2	0	2	0

X (± de).- Media (± Desviación estándar)

AE.- Eventos adversos.

Los elementos clínicos con un número en exponencial indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.5) según las etapas de muestreo.

¹ (0 - 12 h), ² (0 -24 h), ³ (0 - 48 h), ⁴ (0 - 72 h), ⁵ (12 -24 h), ⁶ (12 - 48 h), ⁷ (12 - 72 h), ⁸ (24 - 48 h), ⁹ (24 - 72 h), ¹⁰ (48 - 72 h).

Cuadro 17. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos hematológicos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado

Tiempo (h)	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
Hematocrito (L/L)	0.358 (0.052)	1	0.364 (0.058)	0	0.350 (0.051)	0	0.344 (0.057)	0	0.330 (0.054)	0
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	16.00 (8.12)	0	19.54 (6.88)	1	17.67 (7.35)	1	19.92 (12.03)	1	21.40 (13.20)	1
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	13.04 (7.00)	1	16.28 (6.71)	0	13.84 (5.21)	0	15.31 (9.19)	0	17.46 (11.33)	0
Neutrófilos en banda (x10 ⁹ /L)	0.028 (0.06)	0	0.152 (0.17)	0	0.082 (0.12)	0	0.08 (0.13)	0	0.10 (0.22)	0
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	1.96 (0.92)	0	1.98 (1.00)	0	2.89 (1.80)	0	3.09 (2.41)	0	2.60 (2.10)	0
Monocitos (x10 ⁹ /L)	0.75 (0.55)	0	0.82 (0.58)	0	0.65 (0.43)	0	1.23 (0.98)	0	1.13 (0.75)	0
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0.23 (0.21)	0	0.11 (0.11)	0	0.13 (0.22)	0	0.16 (0.18)	0	0.21 (0.25)	0
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	355.2 (132.2)	0	397.0 (157.7)	0	382.8 (159.2)	0	357.2 (171.2)	0	313.2 (130.3)	0
Sólidos totales ^{5,6} g/L	63.8 (5.93)	0	64.8 (7.01)	0	62.0 (6.96)	0	62.2 (7.88)	0	60.4 (4.77)	0
Fibrinógeno g/L	2.0 (1.22)	0	1.6 (0.55)	0	1.8 (0.45)	0	2.0 (0.00)	0	2.2 (1.10)	0
Eritrocitos nucleados /100 leucocitos	1.4 (3.13)	1	1.0 (2.24)	0	1.4 (2.61)	0	0.0 (0.00)	0	1.6 (3.58)	0

X (± de).- Media (± desviación estándar)

EA.- Eventos adversos.

Los analitos hematológicos con un número exponencial indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.5) según las etapas de muestreo.

¹ (0 - 12 h), ² (0 - 24 h), ³ (0 - 48 h), ⁴ (0 - 72 h), ⁵ (12 - 24 h), ⁶ (12 - 48 h), ⁷ (12 - 72 h), ⁸ (24 - 48 h), ⁹ (24 - 72 h), ¹⁰ (48 - 72 h).

Evaluación de los EA hepáticos

La glucemia y la trigliceridemia fueron diferentes estadísticamente pero se mantuvieron dentro de los valores de referencia a lo largo del estudio. Los valores de las enzimas ALT, AST y FA estuvieron elevados durante el estudio, sin embargo fueron similares antes y después de la administración del vector adenoviral. A pesar de que la disminución de proteínas en el período 0-72 h fue estadísticamente significativa, los resultados se mantuvieron dentro de los valores de referencia. La albúmina siguió la misma conducta con disminución gradual con diferencia estadística significativa entre los períodos 0-48 y 0-72 h (cuadro 18).

Evaluación de los EA del equilibrio ácido base

No se observaron cambios significativos en K^+ y DIF_{clin} , mientras que en Na^+ , Cl^- y HCO_3^- se presentó una disminución a las 12 h post administración del Ad5 β -gal y fueron diferentes significativamente entre el período de 0-12 h y para el Na^+ además en el período 12-24 h. Se observó un ligero incremento de grado 1 en la concentración de ANV después de 72h de la administración (cuadro 19).

Evaluación de los EA renales, pancreáticos, músculo corazón, de integridad celular y de urianálisis.

Con excepción de la LDH para la evaluación de integridad celular que incrementó a las 12 y 24 h al grado 1, no fueron cambios estadísticamente significativos, en el resto de los órganos no se observó ningún cambio significativo en ninguno de los animales ni en ninguno de los muestreos (cuadro 20).

Cuadro 18. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos hepáticos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado

Tiempo (h)	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
Glucosa ⁵	4.44 (1.385)	0	4.70 (1.162)	0	4.14 (0.907)	0	4.12 (0.847)	0	4.16 (1.062)	0
Colesterol	5.85 (2.462)	0	6.04 (2.492)	0	6.21 (3.000)	0	6.41 (3.232)	0	6.12 (3.491)	0
Triglicéridos ^{3,10}	0.644 (0.066)	0	0.712 (0.238)	0	0.798 (0.383)	0	0.798 (0.152)	0	0.508 (0.241)	0
Bilirrubina	6.80 (4.930)	1	7.24 (4.958)	0	7.22 (5.444)	0	7.65 (4.830)	0	7.10 (4.357)	0
B. conjugada	3.9 (2.317)	0	4.77 (3.420)	0	4.88 (3.315)	0	4.30 (2.284)	0	3.75 (2.719)	0
B. no conjugada	2.9 (2.653)	1	2.47 (2.13)	0	2.34 (3.017)	0	3.35 (2.552)	0	3.36 (1.899)	0
ALT	213.0 (297.9)	2	220.0 (294.1)	0	223.2 (290.3)	0	215.0 (279.2)	0	176.0 (216.7)	0
AST	90.0 (74.9)	1	114.0 (69.8)	0	114.8 (59.7)	0	76.4 (43.6)	0	68.0 (27.4)	0
FA	871 (1374.2)	2	922 (1393.2)	0	993 (1418.7)	0	1046 (1548.4)	0	1242 (1826.5)	0
Proteínas ⁴	62.6 (10.16)	0	60.2 (7.12)	0	60.2 (8.64)	0	60.6 (8.79)	0	57.0 (6.78)	0
Albúmina ^{3,4}	26.6 (3.44)	1	26.2 (3.96)	0	25.8 (2.78)	0	25.2 (3.27)	0	24.4 (2.70)	0

X (± de).- Media (± desviación estándar)

EA.- Eventos adversos.

B. conjugada.- bilirrubina conjugada; B, no conjugada.- bilirrubina no conjugada; ALT.- alanina aminotransferasa; AST.- aspartato aminotransferasa; FA.- fosfatasa alcalina.

Los analitos hepáticos con un número exponencial indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.5) según las etapas de muestreo.

¹ (0 - 12 h), ² (0 - 24 h), ³ (0 - 48 h), ⁴ (0 - 72 h), ⁵ (12 - 24 h), ⁶ (12 - 48 h), ⁷ (12 - 72 h), ⁸ (24 - 48 h), ⁹ (24 - 72 h), ¹⁰ (48 - 72 h).

Cuadro 19. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos del equilibrio ácido base en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado

Tiempo (h)	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
K ⁺	4.60 (0.468)	0	4.68 (0.564)	0	4.46 (0.490)	0	4.58 (0.352)	0	4.43 (0.548)	0
Na ⁺ 1,5	147.9 (2.49)	0	146.2 (2.10)	0	147.8 (2.92)	0	147.7 (2.38)	0	148.1 (1.62)	0
Cl ⁻ 1	116.2 (2.57)	0	114.7 (2.30)	0	116.0 (3.51)	0	116.0 (1.63)	0	114.3 (3.41)	0
HCO ₃ ⁻ 1	16.2 (1.64)	1	14.2 (1.48)	0	14.4 (1.95)	0	15.2 (2.17)	0	14.0 (3.39)	0
SID _{clin}	31.7 (1.68)	0	31.5 (2.06)	0	31.8 (2.23)	0	31.7 (2.44)	0	33.9 (3.23)	0
ANV	20.1 (2.16)	0	22.0 (0.72)	0	21.8 (1.34)	0	21.0 (2.41)	0	24.3 (5.59)	1

X (± de).- Media (± desviación estándar)

EA.- Eventos adversos.

K⁺.- potasio; Na⁺.- sodio; Cl⁻.- cloro; HCO₃⁻.- bicarbonato; DIF_{clin}.- Diferencia clínica de iones fuertes; ANV.- ácidos no volátiles.

Los analitos del equilibrio ácido base con un número exponencial indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.5) según las etapas de muestreo.

¹ (0 - 12 h), ² (0 - 24 h), ³ (0 - 48 h), ⁴ (0 - 72 h), ⁵ (12 - 24 h), ⁶ (12 - 48 h), ⁷ (12 - 72 h), ⁸ (24 - 48 h), ⁹ (24 - 72 h), ¹⁰ (48 - 72 h).

Cuadro 20. Estadística descriptiva y grados de eventos adversos renales, urianálisis, musculares, cardiacos, de integridad celular y pancreáticos en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo después del ajuste de grado

Tiempo (h)	Riñones									
	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
Urea	6.48 (2.570)	0	5.96 (1.513)	0	7.52 (2.658)	0	5.38 (1.404)	0	7.30 (2.848)	0
Creatinina	74.2 (18.93)	0	79.8 (16.92)	0	72.6 (28.67)	0	77.6 (21.50)	0	73.8 (8.11)	0
Calcio	2.35 (0.110)	0	2.31 (0.269)	0	2.37 (0.141)	0	2.38 (0.163)	0	2.35 (0.123)	0
Fósforo i.	1.31 (0.175)	0	1.50 (0.282)	0	1.35 (0.143)	0	1.34 (0.209)	0	1.71 (0.852)	1

Tiempo (h)	Urianálisis									
	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
Proteínas (g/L)	0.82 (1.23)	0	0.82 (1.23)	0	0.82 (1.23)	0	0.82 (1.23)	0	0.82 (1.23)	0
Glucosa	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Cilindros	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Células renales	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0

Tiempo (h)	Músculo, corazón e integridad celular									
	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
CK	83.2 (32.2)	0	148.6 (98.8)	0	114.6 (43.4)	0	139.8 (101.8)	0	126.0 (89.3)	0
LDH total	96 (57.6)	0	211.6 (137.3)	1	191.2 (95.4)	1	138.2 (62.1)	0	103.4 (56.6)	0

Tiempo (h)	Páncreas									
	0		12		24		48		72	
	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA	X ± de	EA
Amilasa	718.6 (113.9)	0	676.8 (179.9)	0	678.0 (190.2)	0	722.4 (161.1)	0	673.0 (180.1)	0

X (± de).- Media (± desviación estándar)

EA.- Eventos adversos.

Fósforo i.- Fósforo inorgánico; CK.- creatina cinasa; LDH total.- Lactato deshidrogenasa total.

Los analitos con un número exponencial indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.5) según las etapas de muestreo.

¹ (0 - 12 h), ² (0 - 24 h), ³ (0 - 48 h), ⁴ (0 - 72 h), ⁵ (12 - 24 h), ⁶ (12 - 48 h), ⁷ (12 - 72 h), ⁸ (24 - 48 h), ⁹ (24 - 72 h), ¹⁰ (48 - 72 h).

DISCUSIÓN

En nuestro conocimiento, no hay reportes en la literatura sobre la administración ILN en ninguna patología en particular. Las diferentes vías de administración de genes en vectores adenovirales *in vivo*, han tenido diferentes limitaciones y tolerancia. Las principales desventajas de los adenovirus humanos como vectores en la terapia génica incluye a las respuestas inmunomediadas existentes o inducidas y la posible correplicación del Ad recombinante con la presencia de adenovirus naturales (Rasmussen et al., 1999). Una de esas limitaciones es la baja transferencia de genes terapéuticos a órganos diferentes al hígado después de la administración intravenosa (Fechner et al., 1999). Cuando fueron administrados por diferentes vía y dosis se tuvieron diferentes resultados en cuanto a los EA. No se encontraron EA significativos en varios ensayos clínicos; con la administración única intravenosa de 6×10^{12} PV en perros con hemofilia A para la transferencia del factor VIII (Zhang et al., 1999), con la administración directa a la arteria hepática de 2×10^{12} PV en total (Manno et al., 2006), con la administración intraprostática de 1×10^{12} (Dwyer et al., 2005), con dosis intravenosa de 8.57×10^{11} /PV/kg en perros con hemofilia B (Ehrhardt et al., 2003), lo que coincide con nuestro trabajo, sin embargo, cuando las dosis fueron de 3×10^{12} /VP/kg (Brunetti-Pierri et al., 2005) o de 6×10^{11} /VP/kg (Gallo-Penn et al., 2001), se observó pérdida de integridad hepatocelular transitoria (por incremento de ALT, AST, AP), muscular (por incremento de CK) y de la hemostasia primaria por trombocitopenia, que no coincide con nuestros resultados a dosis hasta de 1.84×10^{11} /PV/kg y 1.54×10^{12} /PV/kg que resultaron sin cambios.

Se pueden observar EA después de la administración *in situ*, por las proteínas que expresan y no por el adenovirus propiamente (Matsukura et al., 1999). La vía de administración y el tipo de vector afecta el nivel y la duración de la expresión de la proteína terapéutica (Liles et al., 1997). Se considera la vía *in situ* como la mejor para la transferencia de genes terapéuticos en cáncer (Matsukura et al., 1999). El objetivo de este método es de incrementar los efectos de una dosis en un tejido específico, mejorar la eficacia antineoplásica

y reducir o inclusive eliminar el período de inmunosupresión así como otros EA. De esta forma, los tejidos neoplásicos reciben elevadas cantidades de la proteína terapéutica con una reducción en la distribución sistémica hacia otros órganos sanos sensibles. La administración del vector adenoviral por vía ILN efectuada en el presente ensayo clínico, favorece mucho este principio, pues antes de pasar a sangre periférica y distribución a otros órganos más sensibles, pasa por otros linfonodos o linfocentros efectuando su actividad terapéutica. La ligera disminución del hematocrito obtenida es asociada a la evolución natural de casos de linfosarcoma multicéntrico (Brooks et al., 1987; Caldin et al., 2005; Fukuoka et al., 2004; Tecles et al., 2005; Weiss, 2005) y no está relacionada con la administración adenoviral, ya que la anemia es una de las manifestaciones paraneoplásicas más comunes en oncología veterinaria y humana (Bergman, 2001). La frecuencia cardíaca se elevó a consecuencia de la anemia, frecuentemente se observa esto en otros pacientes con cáncer (Pronzato, 2006). La leucocitosis neutrófila corresponde en nuestro estudio con los hallazgos reportados en perros con linfosarcoma (Bergman, 2001). La disminución gradual de sólidos totales, proteínas totales y albúmina no se relacionó al tratamiento. La hipoproteinemia e hipoalbuminemia frecuentemente se asocian a la administración de fármacos experimentales y son consideradas respuestas tóxicas secundarias (Kreitman et al., 2005; Robertson et al., 2006). Sin embargo, como en este estudio, esos cambios también son normalmente presentes en linfosarcoma (Price et al., 1991). Esta disminución se asocia a una disminución de su síntesis ya que es una proteína de fase aguda negativa, es decir, disminuye su producción (Latimer et al., 2003). La diferencia significativa de los sólidos totales se relaciona a una ligera hemoconcentración a las 12 h. Aunque no fue estadísticamente significativo el incremento de la LDH a las 12 y 24 h post administración del Ad5 β -gal, es probable que sea reflejo de un incremento en la destrucción celular secundaria a la infección adenoviral, las dimensiones de los linfonodos fueron significativamente inferiores a la necropsia, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la lectura a las 72 h se efectuó del linfonodo aislado, sin considerar piel y tejidos subcutáneos, por lo que estos resultados se deben tomar con cautela. La evaluación de la

integridad hepática no tuvo cambios durante el desarrollo del ensayo clínico y fue independiente a la dosis a diferencia de lo publicado (Gallo-Penn et al., 2001). Esta diferencia probablemente se debe a la vía de administración que (IV), a la dosis que fue superior a la administrada en este trabajo (3×10^{12} PV/kg contra 1.54×10^{12} PV/kg) así como al tiempo de evaluación que fue a los 10-20 días, por lo que asumimos más una relación con la proteína expresada que al propio virus (Matsukura et al., 1999). La diferencia encontrada entre el muestreo de 0, 12 y 24 h de los electrólitos estuvo relacionada con el grado de hidratación de los perros, ya que su consumo de agua y apetito mejoró a partir de las 12 h posteriores a la administración del vector hasta el final del estudio. Los EA marginales de los ANV a las 72 h son compatibles con una ligera pseudoacidosis metabólica por una falsa disminución de HCO_3^- debida a consumo *in vitro* ya que la separación y evaluación de esas muestras fue después de 12 h del muestreo (Stockham and Scott, 2002).

Prácticamente todos los cambios clínicos y de laboratorio se consideraron no relacionados al vector adenoviral sino a la evolución normal de la enfermedad que se encontraba en los estadios avanzados.

CONCLUSIONES

En conocimiento de los autores, es el primer reporte de terapia génica con administración intralinfonodal. La administración del vector Ad5 β -gal en perros con linfoma multicéntrico espontáneo a elevadas dosis no mostró EA clínicos o de laboratorio significantes. Esto sugiere que los adenovirus pueden ser vectores seguros para el uso en casos de terapia génica en linfoma. Estos datos pueden ser tomados como base para considerar la vía intralinfonodal como una ruta apropiada de administración de medicamentos sin eventos adversos en linfoma canino y un potencial modelo para la investigación aplicada de terapia en metástasis linfonodales en animales y en el ser humano.

REFERENCIAS

1. Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., Hauswirth, W.W., and Bennett, J. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature Genetics*. 28(1), 92-95.
2. Andrawiss, M., Maron, A., Beltran, W., Opolon, P., Connault, E., Griscelli, F., Yeh, P., Perricaudet, M., and Devauchelle, P. 2001. Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *Journal of Gene Medicine* 3(3), 228-239.
3. Ayuso, E., Chillon, M., Garcia, F., Agudo, J., Andaluz, A., Carretero, A., Monfar, M., Moya, M., Montane, J., Otaegui, P.J., and Bosch, F. 2006. In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Molecular Therapy* 13(4), 747-755.
4. Barton, K.N., Tyson, D., Stricker, H., Lew, Y.S., Heisey, G., Koul, S., de la, Z.A., Yin, F.F., Yan, H., Nagaraja, T.N., Randall, K.A., Jin, G.K., Fenstermacher, J.D., Jhiang, S., Ho, K.J., Freytag, S.O., and Brown, S.L. 2003. GENIS: gene expression of sodium iodide symporter for noninvasive imaging of gene therapy vectors and quantification of gene expression in vivo. *Molecular Therapy* 8(3), 508-518.
5. Bergman, P. J. 2001. Paraneoplastic Syndromes. In: S. J. Withrow, S.J. and MacEwen, E.G. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 35-53.
6. Boone, L., Meyer, D., Cusick, P., Ennulat, D., Provencher B.A., Everds, N., Meador, V., Elliot, G., Honor, D., Bounous, D., and Jordan, H. 2005. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology* 34(3), 182-188.
7. Brooks, M.B., Matus, R.E., Leifer, C.E., and Patnaik, A.K. 1987. Use of splenectomy in the management of lymphoma in dogs: 16 cases (1976-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191(8), 1008-1010.

8. Brunetti-Pierri, N., Nichols, T.C., McCorquodale, S., Merricks, E., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., and Ng, P. 2005. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia B after systemic administration of helper-dependent adenoviral vector. *Human Gene Therapy* 16(7), 811-820.
9. Caldin, M., Carli, E., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., Tasca, S., Patron, C., and Lubas, G. 2005. A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. *Veterinary Clinical Pathology* 34(3), 224-231.
10. Cerletti, M., Negri, T., Cozzi, F., Colpo, R., Andreetta, F., Croci, D., Davies, K. E., Cornelio, F., Pozza, O., Karpati, G., Gilbert, R., and Mora, M. 2003. Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Therapy* 10(9), 750-757.
11. Dwyer, R.M., Schatz, S.M., Bergert, E.R., Myers, R.M., Harvey, M.E., Classic, K.L., Blanco, M.C., Frisk, C.S., Marler, R.J., Davis, B.J., O'Connor, M.K., Russell, S.J., and Morris, J.C. 2005. A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer. *Molecular Therapy* 12(5), 835-841.
12. Ehrhardt, A., Xu, H., Dillow, A.M., Bellinger, D.A., Nichols, T.C., and Kay, M.A. 2003. A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia. *Blood* 102(7), 2403-2411.
13. Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H. P., Lamers, J., and Poller, W. 1999. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Therapy* 6(9), 1520-1535.
14. Foley, R., Ellis, R., Walker, I., Wan, Y., Carter, R., Boyle, M., Braciak, T., Addison, C., Graham, F., and Gauldie, J. 1997. Intramarrow cytokine gene transfer by adenoviral vectors in dogs. *Human Gene Therapy* 8(5), 545-553.

15. Frimberger, A. E., Moore, A. S., Rassnick, K. M., Cotter, S. M., O'Sullivan, J. L., and Quesenberry, P. J. 2006. A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20(2), 355-364.
16. Fukuoka, A., Nakayama, H., Nakayama, Y., Yasoshima, A., Uetsuka, K., Fujino, Y., Tsujimoto, H., and Doi, K. 2004. Thymoma in a dog with a part of granular cell proliferation and concurrent lymphoma cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 66(6), 713-715.
17. Gallo-Penn, A.M., Shirley, P.S., Andrews, J.L., Tinlin, S., Webster, S., Cameron, C., Hough, C., Notley, C., Lillicrap, D., Kaleko, M., and Connelly, S. 2001. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 97(1), 107-113.
18. Goto, H., Shuler, F.D., Lamsam, C., Moller, H.D., Niyibizi, C., Fu, F.H., Robbins, P.D., and Evans, C.H. 1999. Transfer of lacZ marker gene to the meniscus. *Journal of Bone and Joint Surgery* 81(7), 918-925.
19. Hackett, N. and Crystal, R. 2000. Adenovirus Vectors for Gene Therapy. In: Templeton N.S. and Lasic D.D. (Eds.) *Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 17-40.
20. Herzog, R.W., Yang, E.Y., Couto, L.B., Hagstrom, J.N., Elwell, D., Fields, P.A., Burton, M., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Podsakoff, G.M., Nichols, T.C., Kurtzman, G.J., and High, K.A. 1999. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nature Medicine* 5(1), 56-63.
21. Impellizeri, J.A., Howell, K., McKeever, K.P., and Crow, S.E. 2006. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Veterinary Journal* 171(3), 556-558.
22. Khurana, V.G., Smith, L.A., Baker, T.A., Eguchi, D., O'Brien, T., and Katusic, Z.S. 2002. Protective vasomotor effects of in vivo recombinant

endothelial nitric oxide synthase gene expression in a canine model of cerebral vasospasm. *Stroke* 33(3), 782-789.

23. Kisseberth, W.C. and MacEwen, E.G. 2001. Complications of Cancer and Its Treatment. In: Withrow, S.J. and MacEwen E.G. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 198-219.
24. Kreitman, R.J., Squires, D.R., Stetler-Stevenson, M., Noel, P., FitzGerald, D.J., Wilson, W.H., and Pastan, I. 2005. Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 23(27), 6719-6729.
25. Laing, E.J., Fitzpatrick, P.J., Binnington, A.G., Norris, A.M., Mosseri, A., Rider, W.D., Valli, V.E., and Baur, A. 1989. Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3(2), 102-108.
26. Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., and Prasse, K.W. 2003. *Duncan and Prasse Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology*, Fourth ed. Blackwell Publishing. Iowa State Press.
27. Lee, J.J., Hughes, C.S., Fine, R.L., and Page, R.L. 1996. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 77(9), 1892-1898.
28. Liles, D., Landen, C.N., Monroe, D.M., Lindley, C.M., Read, M.S., Roberts, H.R., and Brinkhous, K.M. 1997. Extravascular administration of factor IX: potential for replacement therapy of canine and human hemophilia B. *Thrombosis and Haemostasis* 77(5), 944-948.
29. Lundstrom, K. 2004. Gene therapy applications of viral vectors. *Technology in Cancer Research & Treatment* 3(5), 467-477.
30. Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P.K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J.F., Lessard, R.R., Sommer, J.M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H.C., High, K.A., and Kay, M.A. 2006. Successful transduction of liver in hemophilia

by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine* 12(3), 342-347.

31. Matsukura, N., Hoshino, A., Igarashi, T., Hasegawa, H., Okino, T., Onda, M., Iijima, O., Akiyama, K., Goto, T., Takubo, K., Suzuki, S., and Shimada, T. 1999. In situ gene transfer and suicide gene therapy of gastric cancer induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in dogs. *Japanese Journal of Cancer Research* 90(9), 1039-1049.
32. Mayer, M.N. and Larue, S.M. 2005. Radiation therapy in the treatment of canine lymphoma. *Canadian Veterinary Journal* 46(9), 842-844.
33. Moore, A.S., Leveille, C.R., Reimann, K.A., Shu, H., and Arias, I.M. 1995. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Investigation* 13(5), 475-479.
34. Multani, P., White, C.A., and Grillo-Lopez, A. 2001. Non-Hodgkin's lymphoma: review of conventional treatments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2(4), 279-291.
35. National Cancer Institute. The NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events. <http://ctep.cancer.gov> [Version 3.0], 1-72. 12-12-2003. Electronic Citation
36. O'Riordan, C.R., Song, A., and Lanciotti, J. 2003. Strategies to Adapt Adenoviral Vectors to targeted delivery. In: Machida, C.A. (Ed.), *Viral vectors for Gene Therapy. Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 89-112.
37. Plotnikov, A.N., Sosunov, E.A., Qu, J., Shlapakova, I.N., Anyukhovskiy, E.P., Liu, L., Janse, M.J., Brink, P.R., Cohen, I.S., Robinson, R.B., Danilo, P.Jr., and Rosen, M.R. 2004. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 109(4), 506-512.
38. Price, G.S., Page, R.L., Fischer, B.M., Levine, J.F., and Gerig, T.M. 1991. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5(5), 259-262.

39. Pronzato, P. 2006. Cancer-related anaemia management in the 21st century. *Cancer Treatment Reviews* 32 (Suppl 2), S1-S3.
40. Rasmussen, U.B., Benchaibi, M., Meyer, V., Schlesinger, Y., and Schughart, K. 1999. Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells. *Human Gene Therapy* 10(16), 2587-2599.
41. Robertson, M.J., Mier, J.W., Logan, T., Atkins, M., Koon, H., Koch, K.M., Kathman, S., Pandite, L.N., Oei, C., Kirby, L.C., Jewell, R.C., Bell, W.N., Thurmond, L.M., Weisenbach, J., Roberts, S., and Dar, M.M. 2006. Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research* 12(14 Pt 1), 4265-4273.
42. Stockham, S.L. and Scott, M.A. 2002. Monovalent Electrolytes and Osmolality. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State Press. Blackwell Publishing Co., Ames, Iowa, pp. 337-380 (Chapter 9)
43. Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Ceron, J.J., and Paltrinieri, S. 2005. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19(6), 865-870.
44. Vail, D.M., MacEwen, E.G., and Young, K.M. 2001. Hematopoietic Tumors. B. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In: Withrow, S.J. and MacEwen, E.G. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 558-590.
45. Veterinary co-operative oncology group—common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2004;2, 4, 194–213.
46. Vonderhaar, M.A. and Morrison, W.B. 1998. Lymphosarcoma. In: Morrison, W.B. (Ed.), *Cancer in Dogs and Cats. Medical and Surgical Management*. Williams and Wilkins, Baltimore pp. 667-695.
47. Weiden, P.L., Storb, R., Deeg, H.J., and Graham, T.C. 1979. Total body irradiation and autologous marrow transplantation as consolidation

therapy for spontaneous canine lymphoma in remission. *Experimental Hematology* 7 Suppl 5, 160-163.

48. Weiss, D.J. 2005. Bone marrow necrosis in dogs: 34 cases (1996-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227(2), 263-267.
49. Williams, L.E., Johnson, J.L., Hauck, M.L., Ruslander, D.M., Price, G.S., and Thrall, D.E. 2004. Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(5), 703-709.
50. Zhang, W.W., Josephs, S.F., Zhou, J., Fang, X., Alemany, R., Balague, C., Dai, Y., Ayares, D., Prokopenko, E., Lou, Y.C., Sethi, E., Hubert-Leslie, D., Kennedy, M., Ruiz, L., and Rockow-Magnone, S. 1999. Development and application of a minimal-adenoviral vector system for gene therapy of hemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis* 82(2), 562-571.

Distribución de β -galactosidasa por transferencia adenoviral como modelo de terapia génica intralinfonodal en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo

Luis Núñez Ochoa^{a*}, Francisco José Trigo Tavera^a, Vicente Madrid Marina^b, Andrés Gutiérrez López^c

Distribution of β -galactosidase by adenoviral transfer as a model for intralymphonodal gene therapy in dogs with spontaneous multicentric lymphosarcoma

^a Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, México, D. F. 04510.

^b Dirección de Virología Molecular, Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad No. 655 Cuernavaca, Morelos, 62508, México.

^c Unidad de Terapia Celular. Instituto Nacional de Rehabilitación, Seguro Social. Calzada México Xochimilco 289. México, D. F. 14832.

^c Domicilio actual. Direction of Medical Affairs. Oculus Innovative Sciences 1129 North McDowell Blvd. Petaluma, California. 94954, USA.

*Correspondencia. Dr. Luis Núñez-Ochoa. Patología Clínica. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, México, D. F. 04510 Teléfono y fax (5255) 5622-5878 ó 5622-5943 ext. 23. E-mail: luisno@servidor.unam.mx

Resumen

La terapia génica en cáncer se administra principalmente por vía intravenosa e *in situ* mediante el empleo de vectores virales y no virales. La administración sistémica del vector transfiere el gen terapéutico al tejido neoplásico, pero también a otros órganos. El objetivo de este estudio fue evaluar la distribución de expresión del gen reportero Lac Z insertado en un vector adenoviral y administrado vía intralinfonodal (ILN) en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo. La distribución de la expresión de la proteína β -galactosidasa de un adenovirus no replicativo recombinante (Ad β -gal) fue evaluada en 6 perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo mediante la exposición al sustrato cromogénico X-gal, 72 h después de su administración ILN. Se emplearon dosis de 0 (control), $1,35 \times 10^{10}$, $2,53 \times 10^{10}$, $6,10 \times 10^{10}$, $18,38 \times 10^{10}$, y $153,85 \times 10^{10}$ partículas virales (PV)/kg. La expresión se presentó en un 100% del tejido linfocítico neoplásico que incluye, linfonodos y bazo, con menor intensidad se expresó en órganos infiltrados con linfocitos neoplásicos: hígado, médula ósea y pulmones. La expresión de β -gal fue exclusiva en tejido linfocítico neoplásico y en sitios de metástasis. Esto permite mejorar la eficiencia en la transferencia del gen terapéutico con menores dosis y reducir los riesgos de toxicidad y también potencialmente menos inmunogénico. La terapia génica adenoviral vía intralinfonodal tiene un elevado potencial para su aplicación en animales y humanos con linfosarcoma y también para metástasis linfonodales.

Palabras clave: Terapia génica, linfosarcoma, adenovirus, vía intralinfonodal, perro.

Abstract

Gene therapy administration in cancer is mainly performed by intravenous, oral, and *in situ* routes, with viral or nonviral delivery vector systems. Systemic administration frequently transfers the therapeutic gene to neoplastic tissue and as well as to other organs. The objective of this study was to evaluate the distribution expression of *Lac Z* reporter gene by adenoviral transfer administered by intralymphonodal route (ILNR) in dogs with lymphosarcoma. The distribution of β -galactosidase protein expression by a non replicative recombinant adenovirus (Ad β -gal) delivery was determined in six dogs with spontaneous multicentric lymphosarcoma, 72 h after ILNR administration using X-gal chromogenic substrate. The doses administered were 0 (control), 1.35×10^{10} , 2.53×10^{10} , 6.10×10^{10} , 18.38×10^{10} and 153.85×10^{10} viral particles (VP) /kg. The expression was manifested in 100% of lymphocytic tissue, including lymph nodes and spleen. The infiltrated organs with neoplastic lymphocytes: liver, bone marrow and lungs were positive but with lower intensity. Conclusion. The expression of β -gal was restricted to neoplastic lymphocytic tissue and metastatic sites. The ILNR would enhance gene therapy efficacy to a specific cell type and permit the delivery of lower doses, which result in reduced toxicity and may also potentially be less immunogenic. This suggests that adenoviral gene therapy by ILNR is a potential model of administration in animals and human beings with lymphosarcoma and also for metastasis to lymph nodes.

Key words: Gene therapy, lymphosarcoma, adenovirus, intralymphonodal route, dog.

INTRODUCCIÓN

Una de las limitaciones generales en el éxito de la distribución de genes terapéuticos en la terapia génica *in vivo* es la dificultad para lograr su transferencia a las células específicas [13]. La mayoría de los vectores virales para la terapia génica, tienen un tropismo tisular muy amplio, implicando que pueden infectar una amplia gama de tejidos, esto limita la seguridad de administración por vía sistémica [7]. Algunos tejidos que son aparentemente refractarios pueden ser infectados según la vía de administración [5]. La terapia génica en cáncer se ha administrado por varias vías, cuando el vector empleado es viral, la vía más recurrida en estudios *in vivo* es la intratumoral [5, 23], sin embargo, desde el punto de vista práctico, la administración sistémica por vía intravenosa puede ser la de mayor interés clínico [7]. Cuando el vector es adenoviral en particular, se han empleado las vías intraperitoneal [15], intranasal [12], intravenosa [16, 25], intracardiaca [24], intraneoplásica [26], en sistema nervioso central [8], en glándulas salivales [29], intramuscular [10] e intramedular [2] entre otros. La administración intravenosa resulta con una transferencia principalmente en hepatocitos y subsecuente hepatotoxicidad, debido a que los hepatocitos expresan elevados niveles del receptor de adenovirus y coxackie virus (CAR) [1]. La infección por un vector adenoviral se inicia formando complejos entre la proteína de la fibra y CAR, expresado en forma ubicua en la membrana de las células hospedadoras [28] y continúa mediante la asociación entre el pentón de base y las integrinas α_v para la internalización del virus [18].

Las neoplasias espontáneas son buenos modelos para la evaluación de diferentes tipos de terapia con aplicación en animales y humanos. La elevada incidencia en animales de algunas neoplasias con comportamiento biológico similar, tamaño corporal, respuestas

comparables a agentes citotóxicos y su corta vida media, son factores que contribuyen a las ventajas en el empleo de modelos animales como el perro [22]. Una de esas neoplasias es el linfosarcoma, que despierta interés por su aplicación en humanos, cuya incidencia anual en perros es de 1 en 3500 en la clínica, mientras que a nivel laboratorial es de 1 en 350 casos y corresponde a 9,42 % de todas las neoplasias con diagnóstico citológico [17]. El objetivo de este estudio fue evaluar la distribución de expresión de un gen reportero insertado en un vector adenoviral y administrado vía intralinfonodal (ILN) en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Instituto Nacional de Rehabilitación y el laboratorio de Patología Clínica Veterinaria Experto en la ciudad de México. La distribución de expresión del gen reportero fue evaluado 72 h después de la administración ILN del vector adenoviral en un vehículo D-MEM/F-12 (11039-021 GIBCO™ Invitrogen Co. EUA).

Animales

Se emplearon 6 perros adultos de 2 a 7 años de edad (un macho y cinco hembras) con linfosarcoma multicéntrico espontáneo. Como criterio de inclusión se seleccionaron aquellos que no estuvieron bajo terapia en 3 meses anterior al trabajo. Fueron mantenidos en jaulas metálicas individuales durante todo el curso de la investigación. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité local de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Diagnóstico de linfosarcoma

En todos los animales se realizó el diagnóstico clínico, radiológico y citológico.

Adenovirus

Se empleó un adenovirus (Ad5) no replicativo recombinante (con las regiones E1 y E3 eliminadas) como vector portador del gen reportero lacZ (cortesía del Dr. Curiel del Centro de Terapia Génica de la Universidad de Alabama EUA), el cual codifica una proteína que corresponde a la enzima beta-galactosidasa (Ad5 β -gal), este vector fue amplificado y titulado según el Manual de Aplicación Versión 1,2 de AdEasy™ Vector System Quantum Technologies y purificado mediante el kit de purificación Adeno-X™ Virus Mini Purificator kit de Clontech Laboratories, Inc. EUA.

Prueba de infectividad del adenovirus

Antes de la administración ILN del Ad5 β -gal se llevó a cabo la prueba de infectividad en células Hela (VCA-1001, Amaxa, Inc. EUA). El propósito de esta prueba fue determinar si el adenovirus recombinante empleado era capaz de infectar y expresar la β -galactosidasa en una estirpe celular diferente a las células de la línea 293, ya que éstas le permiten replicar por tener la región complementaria que provee la función de E1 eliminada. Al cultivo de células Hela se le adicionó el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) hasta cubrir las completamente e incubar a 37 °C durante 12 horas (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies, Montreal, Canadá) para la detección de β -galactosidasa. Esta enzima convierte el sustrato en un producto de color azul indicando las células que fueron infectadas por el adenovirus y que expresan esa enzima.

Pruebas preliminares de distribución linfonodal

Se emplearon 2 perros sanos para la evaluación de distribución por administración ILN bajo anestesia general, antes de su sacrificio, en uno se efectuó una evaluación radiológica de distribución de 1 mL de medio de contraste (Ioditrast® 76, Justesa,

México) en 0 a 5 min y en el otro, con 1 mL de colorante azul de metileno al 1 % por administración ILN y evaluación a los 30 min por disección para asegurar la introducción del vehículo directamente en linfonodo y su alcance de distribución.

Administración intralinfonodal de Ad5 β -gal

Se administró 1 mL de Ad5 β -gal vía intralinfonodal a una concentración de partículas virales (PV) de 0,0 (control), 1,35, 2,52, 6,1, 18,38 y 153,85 X10¹⁰/kg en 6 perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo. En el perro control se administró 1 mL del medio “Dulbecco's Modification of Eagle Medium (DMEM) F-12 sin fenol” (GIBCO), mismo que fue empleado como vehículo del virus en los demás perros. La administración se efectuó por inyección lenta (10 s) en los linfonodos cervicales superficiales y en los poplíteos [3] (0,25 mL por linfonodo) en una sola administración con jeringas de 1 mL.

Evaluación de la distribución de β -galactosidasa adenoviral transgénica

Se efectuó el sacrificio de los perros mediante una sobredosis de pentobarbital sódico a las 72 h de la administración del Ad5 β -gal. Se obtuvieron los linfonodos mandibulares, cervicales superficiales, axilares, mediastínicos, poplíteos, mamarios e iliacos medios, bazo, hígado, pulmones, cerebro, cerebelo, páncreas, aurícula derecha, ventrículo izquierdo y riñones que fueron incluidos en solución salina fosfato amortiguada (PBS). En la siguiente hora se llevó a cabo por medio de la inclusión de los órganos en el sustrato cromogénico X-Gal a 37 °C durante 12 h (AdEasy™ Vector System Quantum Technologies. Montreal, Canadá) para la detección de β -galactosidasa en los tejidos seleccionados. Se calificó la intensidad de coloración como ligero, moderado e intenso en los órganos positivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 6 perros fueron seleccionados posteriormente al diagnóstico de linfosarcoma mediante el examen físico, los signos clínicos presentados por los 6 perros fueron compatibles con linfosarcoma multicéntrico, aunque en los casos 1 y 2 presentaron hifema bilateral por metástasis ocular y el 1, 2 y 4 pérdida de peso y edema como signos paraneoplásicos, mientras que los casos 3 y 5 solamente se encontró linfadenomegalia generalizada (TABLA I). Los cambios radiológicos más relevantes fueron el incremento de densidad mediastínica, desplazamiento ventral del colon, desplazamiento dorsal de la tráquea, esplenomegalia, hepatomegalia e incremento de densidad pulmonar (TABLA II). El diagnóstico de linfosarcoma generalizado se basó en los hallazgos clínicos, con la presencia principalmente de linfadenomegalia generalizada, los signos radiológicos y el examen citológico (FIG. 1-3).

En la prueba de infectividad del adenovirus se constató la infectividad y la transferencia de β -galactosidasa con positividad en las células HeLa (FIG. 4).

La distribución linfonodal del medio de contraste se observa que después de la administración poplítea derecha de 1 mL de medio de contraste, en un minuto se encuentra el trayecto hacia el linfonodo iliaco medial derecho, después de los 5 minutos disminuye la intensidad del medio. El azul de metileno se encontró desde el sitio de administración, el linfonodo poplítea derecho, hasta el linfonodo iliaco medial derecho a los 30 minutos de administración (FIG. 5).

La distribución de la expresión β -gal en los tejidos evaluados se presentó en todos los linfonodos, en bazo, hígado, pulmones y médula ósea; mientras que en cerebro, cerebelo, páncreas, aurícula derecha, ventrículo izquierdo y riñones resultaron negativos en todos los animales sin importar la dosis (FIG. 6). La intensidad fue elevada de

manera similar en todo el tejido linfocítico incluyendo al bazo sin importar la dosis recibida, mientras que en el hígado, médula ósea y pulmones fue de moderada a ligera, encontrándose ésta proporcional a las dosis empleadas (TABLA III).

Se ha señalado que es mejor destruir el cáncer que corregirlo genéticamente mediante las estrategias aprobadas en la terapia génica del cáncer, que podrían dividirse en compensación de la mutación, quimioterapia molecular, inmunopotenciación genética, agentes oncolíticos e inhibición de la angiogénesis [14]. La búsqueda de mejores métodos, protocolos o vías de administración están orientados a disminuir la diseminación del fármaco a otros tejidos, es decir, ser más específico y así mejorar el nivel de infección y traducción de los genes terapéuticos, así como el de disminuir su inmunogenicidad, toxicidad y su potencial inflamatorio [21].

Según los resultados obtenidos bajo el protocolo descrito, la dosis no afectó la distribución de la expresión viral a diferencia de lo encontrado en ratones con adenocarcinoma mamario experimental por inyección subcutánea, probablemente debido al tipo de neoplasia y por el inmediato ingreso al torrente sanguíneo y su llegada a hígado [27], como también depende de la expresión de CAR, aunque no es la única causa de biodistribución [14].

Los adenovirus tienen un tropismo preferencial hacia hígado y pulmones cuando se administra el adenovirus por vía intravenosa o intraperitoneal [15], sin embargo, en un estudio efectuado con el mismo vector pero con administración intraperitoneal [15] o intraportal [11] se encontró expresión de β -gal en corazón y riñones a diferencia del presente estudio en donde resultó negativo en estos órganos en todos los perros. Esto puede ser explicado por la vía y la velocidad de administración, así como la posibilidad de mayor contacto con las células, ya que en los perros con linfosarcoma el retorno

linfático se ve afectado, esto incrementa el tiempo de contacto virus-célula facilitando la infección. Después de la administración intravenosa de vectores adenovirales se encuentran hasta el 90% de los virus en los pulmones y cuando es vía intraportal hasta el 55% [6]. En un estudio con administración adenoviral se encontró que la cantidad de copias por μg de ADN en hígado es 10 veces mayor que en bazo y estómago, 100 veces el de pulmones, riñones corazón músculo y ovarios y 1000 veces el de linfonodos y cerebro [11]. Está demostrado que la eficiencia de infección depende de la dosis (concentración viral por célula), cuando es elevada puede infectar células que normalmente son consideradas refractarias [4, 27]. También se ha encontrado resistencia de las células de linfosarcoma a la infección adenoviral [5] por la insuficiente expresión de receptores CAR [9], sin embargo, se ha encontrado que la infección no depende exclusivamente de los receptores CAR [4], el cual no es el principal determinante del tropismo adenoviral *in vivo* [19]. Si un gramo de neoplasia contiene aproximadamente 10^9 células, entonces 1×10^{10} PV infectan 10 g de tejido, eso quiere decir que dosis de virus administradas vía intratumoral teóricamente, una dosis de 10^{11} PV puede infectar 100 g de tumor [20].

CONCLUSIONES

En este estudio la expresión de β -gal fue prácticamente exclusiva del tejido linfocítico neoplásico y en sitios de metástasis. Estos resultados sugieren que se puede mejorar la eficiencia en la transferencia del gen terapéutico con menores dosis y con ello, reducir su potencial inmunogénico y los riesgos de toxicidad observados en otros estudios. La terapia génica adenoviral vía intralinfonodal tiene un elevado potencial para su

aplicación en animales y humanos con linfosarcoma y también para metástasis linfonodales.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México Registro N° 172517, la Universidad Nacional Autónoma de México y por fondos del Proyecto LE01-0206 del Laboratorio Veterinario Experto, México D. F.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. ALEMANY, R.; CUIEL, D. T. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. **Gene Ther.** 8: 1347-1353. 2001.
- [2]. BALDIK, Y.; DIWAN, A. D.; APPELYARD, R. C.; FANG, Z. M.; WANG, Y.; MURRELL, G. A. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. **Bone** 37: 32-36. 2005.
- [3]. BARONE, R. ANGIOLOGIE. Système Lymphatique. In: **Anatomie Comparée des mammifères domestiques**. Tome cinquième. Ed. Vigot. 687-878 pp. 1996.
- [4]. CHEN, Z.; AHONEN, M.; HAMALAINEN, H.; BERGELSON, J. M.; KAHARI, V. M.; LAHESMAA, R. High-efficiency gene transfer to primary T lymphocytes by recombinant adenovirus vectors. **J. Immunol. Meth.** 260: 79-89. 2002.
- [5]. HACKETT, N. R.; CRYSTAL, R. G. Adenovirus Vectors for Gene Therapy. In: TEMPLETON N.S., LASIC, D. D. Eds. **Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies** New York, Marcel Dekker, Inc. 17-40 pp. 2000.
- [6]. HACKETT, N. R.; EL, S. T.; LEE, L. Y.; SILVA, I.; O'LEARY, J.; ROSENGART, T. K.; CRYSTAL, R. G. Use of quantitative TaqMan real-time PCR to track the time-dependent distribution of gene transfer vectors in vivo. **Mol. Ther.** 2: 649-656, 2000.
- [7]. HENNING, P.; MAGNUSSON, M. K.; GUNNERIUSON, E.; HONG, S. S.; BOULANGER, P.; NYGREN, P. A.; LINDHOLM, L. Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle

scaffold derived from staphylococcal protein A. **Hum. Gene Ther.** 13: 1427-1439, 2002.

- [8]. HERMENS, W. T.; GIGER, R. J.; HOLTMAAT, A. J.; DIJKHUIZEN, P. A.; HOUWELING, D. A.; VERHAAGEN, J. Transient gene transfer to neurons and glia: analysis of adenoviral vector performance in the CNS and PNS. **J. Neurosci. Meth.** 71: 85-98, 1997.
- [9]. HUREZ, V.; DZIALO-HATTON, R.; OLIVER, J.; MATTHEWS, R. J.; WEAVER, C. T. Efficient adenovirus-mediated gene transfer into primary T cells and thymocytes in a new coxsackie/adenovirus receptor transgenic model. **BMC. Immunol.** 3: 4, 2002.
- [10]. ICHIKURA, H.; ETO, M.; UENO, H.; HARADA, M.; TAKAYAMA, K.; TOKUDA, N.; TATSUGAMI, K.; NAITO, S. In vivo growth of transitional and renal cell carcinoma cell lines can be suppressed by the adenovirus-mediated expression of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor. **Oncol. Rep.** 15: 1333-1337. 2006.
- [11]. KAY, M. A.; LANDEN, C. N.; ROTHENBERG, S. R.; TAYLOR, L. A.; LELAND, F.; WIEHLE, S.; FANG, B.; BELLINGER, D.; FINEGOLD, M.; THOMPSON, A. R. In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. **Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.** 91: 2353-2357. 1994.
- [12]. LEMIALE, F.; KONG, W. P.; AKYUREK, L. M.; LING, X.; HUANG, Y.; CHAKRABARTI, B. K.; ECKHAUS, M.; NABEL, G. J. Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. **J. Virol.** 77: 10078-10087. 2003.
- [13]. MAGNUSSON, M. K.; HONG, S. S.; BOULANGER, P.; LINDHOLM, L. Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. **J. Virol.** 75: 7280-7289. 2001.
- [14]. MAJHEN, D.; MBRIOVIC-RISTOV, A. Adenoviral vectors--how to use them in cancer gene therapy? **Virus Res.** 119: 121-133. 2006.
- [15]. MARTIN-MARTINEZ, M. D.; STOENOIU, M.; VERKAEREN, C.; DEVUYST, O.; DELPORTE, C. Recombinant adenovirus administration in rat peritoneum: endothelial expression and safety concerns. **Nephrol. Dial. Transplant.** 19: 1293-1297. 2004.
- [16]. MOON, C.; MOON, C.; KANG, W. S.; JEONG, D. C.; JIN, J. Y. Distribution of adenoviral vector in brain after intravenous administration. **J. Korean Med. Sci.** 18: 108-111. 2003.

- [17]. NÚÑEZ, O. L. Linfossarcoma en Perros. In: MUCHA, C. J., SORRIBAS, C. E., PELLEGRINO, F. C., (Ed), **Consulta Rápida en la Clínica Diaria**. Buenos Aires, República Argentina, Inter-Médica. 649-652 pp. **2005**
- [18]. PARKER, A. L.; WADDINGTON, S. N.; NICOL, C. G.; SHAYAKHMETOV, D. M.; BUCKLEY, S. M.; DENBY, L.; KEMBALL-COOK, G.; NI, S.; LIEBER, A.; MCVEY, J. H.; NICKLIN, S. A.; BAKER, A. H. Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. **Blood**. 108: 2554-2561. 2006.
- [19]. SMITH, T. A.; IDAMAKANTI, N.; MARSHALL-NEFF, J.; ROLLENCE, M. L.; WRIGHT, P.; KALOSS, M.; KING, L.; MECH, C.; DINGES, L.; IVERSON, W. O.; SHERER, A. D.; MARKOVITS, J. E.; LYONS, R. M.; KALEKO, M.; STEVENSON, S. C. Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates. **Hum. Gene Ther.** 14: 1595-1604. 2003.
- [20]. TANNOCK, I. F. Cell Proliferation. In: TANNOCK, I. F., HILL, R. P. (EDS) *The Basic Science of Oncology*. Toronto, Canada, McGraw-Hill, Inc. 154-177 pp. 1992.
- [21]. TOMANIN, R.; SCARPA, M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. **Curr. Gene Ther.** 4: 357-372. 2004.
- [22]. VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Invest.** 18: 781-792. 2000.
- [23]. VALERE, T. Gene therapy in the clinic: human trials of gene therapy. In: LEMOINE, NR, (ED) **Understanding Gene Therapy**. New York, BIOS Scientific Publishers L. 141-154 pp. 1999.
- [24]. WANG, J.; MA, Y.; KNECHTLE, S. J. Adenovirus-mediated gene transfer into rat cardiac allografts. Comparison of direct injection and perfusion. **Transplant.** 61: 1726-1729. 1996.
- [25]. WANG, X.; OLMSTED-DAVIS, E.; DAVIS, A.; LIU, S.; LI, Z.; YANG, J.; BRUNICARDI, F. C. Specific targeting of pancreatic islet cells in vivo by insulin-promoter-driven adenoviral conjugated reporter genes. **World J. Surg.** 30: 1543-1552. 2006.
- [26]. WANG, Y.; HALLDEN, G.; HILL, R.; ANAND, A.; LIU, T. C.; FRANCIS, J.; BROOKS, G.; LEMOINE, N.; KIRN, D. E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models. **Nat. Biotechnol.** 21: 1328-1335. 2003.
- [27]. WANG, Y.; WANG, H.; LI, C. Y.; YUAN, F. Effects of rate, volume, and dose of intratumoral infusion on virus dissemination in local gene delivery. **Mol. Cancer Ther.** 5: 362-366. 2006.

- [28]. YUN, C. O.; YOON, A. R.; YOO, J. Y.; KIM, H.; KIM, M.; HA, T.; KIM, G. E.; KIM, H.; KIM, J. H. Coxsackie and adenovirus receptor binding ablation reduces adenovirus liver tropism and toxicity. **Hum. Gene Ther.** 16: 248-261. 2005.
- [29]. ZHENG, C.; VOUTETAKIS, A.; KOK, M. R.; GOLDSMITH, C. M.; SMITH, G. B.; ELMORE, S.; NYSKA, A.; VALLANT, M.; IRWIN, R. D.; BAUM, B. J. Toxicity and biodistribution of a first-generation recombinant adenoviral vector, in the presence of hydroxychloroquine, following retroductal delivery to a single rat submandibular gland. **Oral Dis.** 12, 137-144. 2006.

TABLA I. HALLAZGOS CLÍNICOS DE 6 PERROS CON LINFOSARCOMA MULTICÉNTRICO ESPONTÁNEO

TABLE I. CLINICAL FINDINGS IN 6 DOGS WITH SPONTANEOUS MULTICENTRIC LYMPHOSARCOMA

	Nº de caso	1	2	3	4	5	Control
Signos Clínicos							
Linfadenomegalia generalizada		x	x	x	x	x	x
Hifema bilateral		x	x				
Pérdida de peso		x	x		x		x
Tos			x				
Disnea			x				
Fiebre			x				
Depresión		x	x		x		x
Nódulos subcutáneos generalizado			x				
Edema		x	x		x		
Anorexia		x	x		x		x

TABLA II. HALLAZGOS RADIOLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LINFOSARCOMA EN 6 PERROS CON LINFADENOMEGALIA GENERALIZADA

TABLE II. RADIOLOGICAL FINDINGS IN LYMPHOSARCOMA DIAGNOSIS IN 6 DOGS WITH GENERALIZED LYMPHADENOMEGALY

	Nº de caso	1	2	3	4	5	Control
Signos Radiológicos							
Desplazamiento ventral de colon			x	x	x		x
Esplenomegalia	x	x	x				
Hepatomegalia	x		x				
Desplazamiento dorsal de tráquea			x	x	x		x
Densidad mediastinal incrementada			x	x	x	x	x
Incremento de densidad pulmonar	x			x			

TABLA III. FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE BETA GALACTOSIDASA MEDIANTE EL SUSTRATO CROMOGÉNICO X-GAL EN 6 PERROS CON LINFOSARCOMA MULTICÉNTRICO ESPONTÁNEO A LAS 72 h POSTERIORES A LA ADMINISTRACIÓN ILN DEL VECTOR AD5 β -GAL EN DIFERENTES DOSIS

TABLE III. FREQUENCY OF DETECTION OF BETA-GALACTOSIDASE BY X-GAL STAIN IN 6 DOGS WITH SPONTANEOUS MULTICENTRIC LYMPHOSARCOMA AT DIFFERENT DOSES, 72 h AFTER ILN ADMINISTRATION OF AD5 β -GAL VECTOR

Perro	Control	1	2	3	4	5
Tejidos	0 PV X10 ¹⁰ /kg	1.35 PV X10 ¹⁰ /kg	2.52 PV X10 ¹⁰ /kg	6.1 PV X10 ¹⁰ /kg	18.38 PV X10 ¹⁰ /kg	153.85 PV X10 ¹⁰ /kg
LN poplíteos	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN mamarios	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN mandibulares	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN axilares	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN cervicales	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN mediastínicos	-	3+	3+	3+	3+	3+
LN iliacos medios	-	3+	3+	3+	3+	3+
Bazo	-	3+	3+	3+	3+	3+
Hígado	-	+	+	2+	2+	2+
Médula ósea	-	+	+	+	2+	2+
Pulmones	-	+	+	+	2+	2+
Cerebro-cerebelo	-	-	-	-	-	-
Páncreas	-	-	-	-	-	-
Aurícula derecha	-	-	-	-	-	-
Ventrículo izq.	-	-	-	-	-	-
Riñones	-	-	-	-	-	-
Total	0,0,0/16	3,0,8/16	3,0,8/16	3,1,8/16	0,3,8/16	0,3,8/16

Las muestras de los tejidos fueron obtenidos durante la necropsia a las 72 h de la administración intralinfonodal (ILN) del vector adenoviral con el gen Lac Z que expresa beta galactosidasa. Los datos representan los tejidos positivos y su grado de intensidad de coloración: (+) Ligera, (2+) Moderada y (3+) elevada. En el total, se representan en el numerador los tres grados de intensidad y en el denominador el número de tejidos evaluados.

ILN, Intralinfonodal; PV, partículas virales; Ad5 β -gal, Adenovirus 5 con el gen que expresa beta galactosidasa; LN, linfonodos.

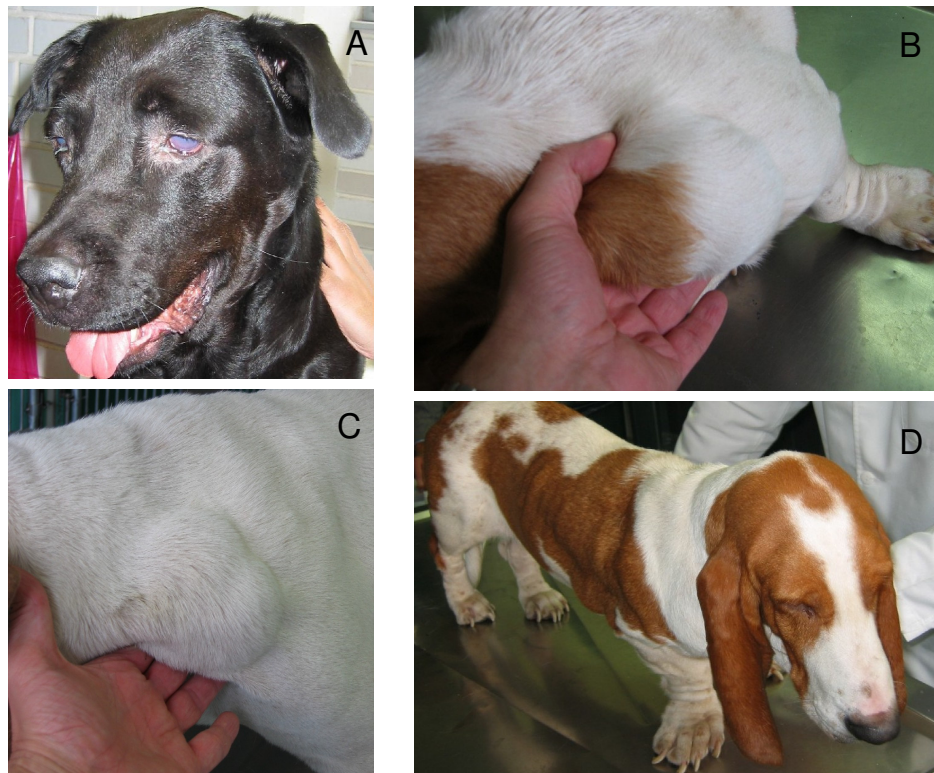


FIGURA 1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LINFOSARCOMA
FIGURE 1. CLINICAL DIAGNOSIS OF LYMPHOSARCOMA

Hallazgos clínicos frecuentes en perros con linfoma multicéntrico.
A. Opacidad ocular bilateral por hifema secundaria a metástasis ocular.
B Y C. Linfadenomegalia generalizada.
D. Depresión.

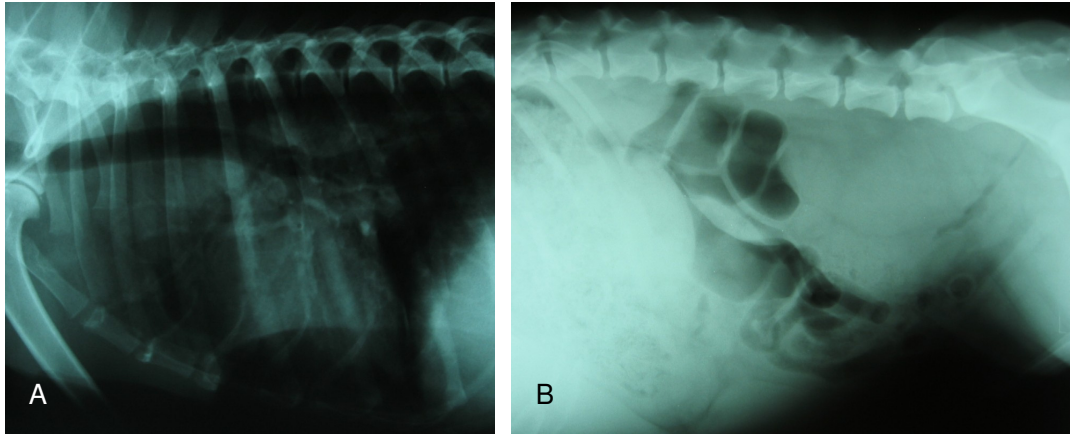


FIGURA 2. DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO DE LINFOSARCOMA
FIGURE 2. RADIOLOGICAL DIAGNOSIS OF LINFOSARCOMA

Cambios radiológicos más frecuentes encontrados en 6 perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo.

A. Desplazamiento dorsal de la tráquea e incremento de densidad en mediastino craneal por linfadenomegalia mediastínica.

B. Desplazamiento ventral de colon por linfadenomegalia de iliacos mediales y hepatomegalia.

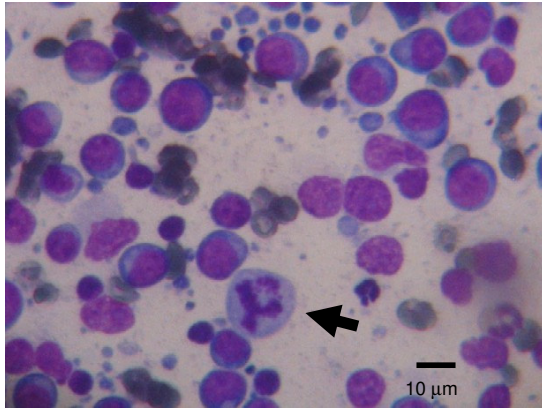


FIGURA 3. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE LINFOSARCOMA
FIGURE 3. CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF LYMPHOSARCOMA

Imagen citológica por aspirado con aguja fina de un caso de linfoma linfoblástico (1000x). Mitosis anormales tripolares (flecha).

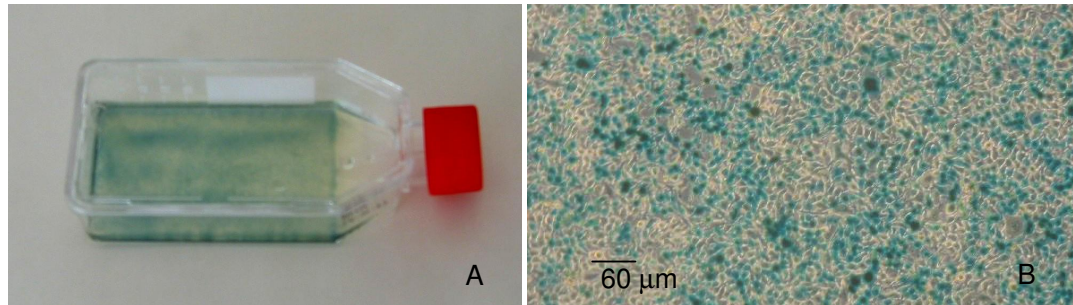


FIGURA 4. PRUEBA DE INFECTIVIDAD DEL ADENOVIRUS Y TRANSFERENCIA DE β -GALACTOSIDASA EN CÉLULAS HELA
FIGURE 4. INFECTIVITY TEST AND TRANSFER OF β -GALACTOSIDASE IN HELA CELLS

- A. Aspecto macroscópico
- B. Aspecto microscópico (100X) a elevada confluencia.

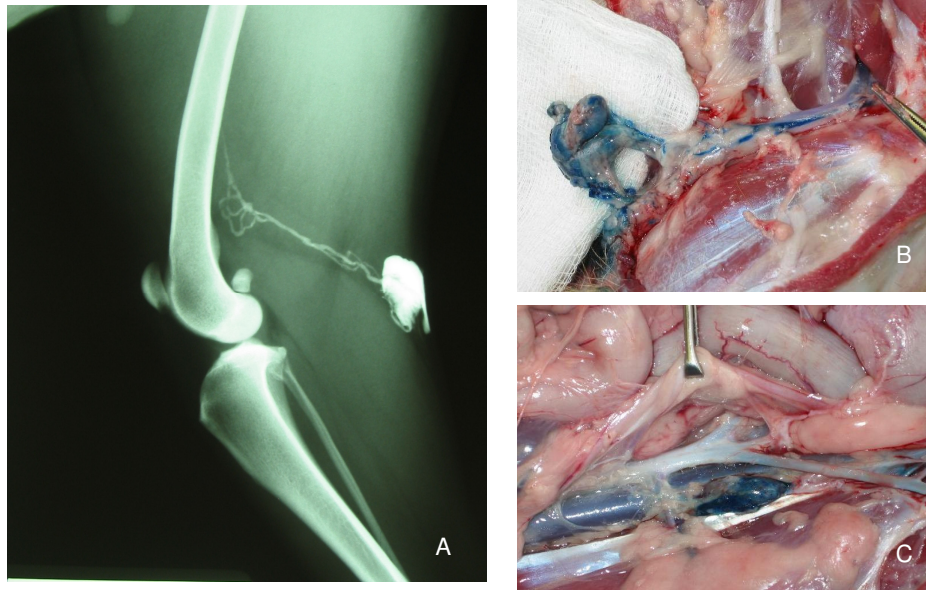


FIGURA 5. PRUEBAS PRELIMINARES DE DISTRIBUCIÓN LINFONODAL
FIGURE 5. PRELIMINARY TEST OF LYMPHONODAL DISTRIBUTION

A. Evaluación radiológica de distribución de 1 mL de medio de contraste (Ioditrac@ 76, Justesa, México) inmediatamente después de la administración del medio de contraste.

B y C. Distribución de colorante azul de metileno por administración de 1 mL ILN y evaluación a los 30 min para asegurar la introducción del vehículo directamente en linfonodo y su alcance de distribución.

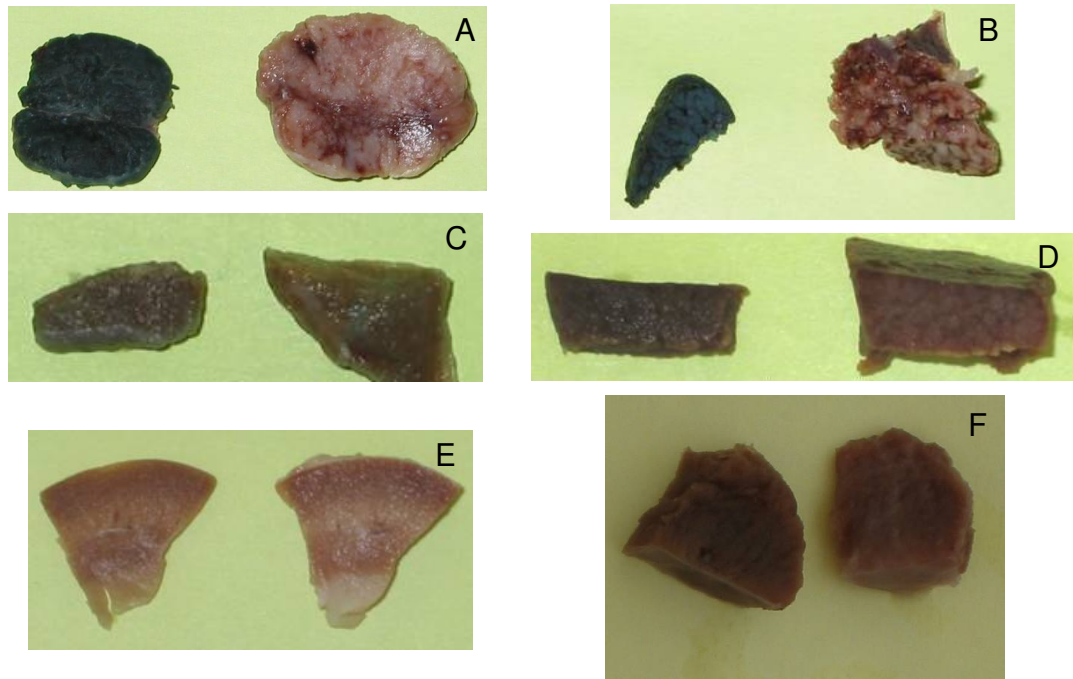


FIGURA 6. EXPRESIÓN β -GAL COMPARATIVA EN VARIOS TEJIDOS
 FIGURE 6. COMPARATIVE EXPRESSION β -GAL IN SEVERAL TISSUES

Expresión beta galactosidasa en perros con linfosarcoma multicéntrico espontáneo. Los 6 tejidos fueron sometidos al sustrato X-Gal para detectar la presencia de β -galactosidasa, los del lado izquierdo recibieron el vector adenoviral con el gen que expresa beta galactosidasa en porcentaje, los del lado derecho de cada pareja es el control y no expresa ninguno beta galactosidasa.

A: Linfonodos (100%). B: Bazo (100%). C: Pulmones (20%). D: Hígado (30%). E: Riñones (0%). F: Ventrículos (0%).

Anexo 1.

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Ciudad Universitaria, a _____ de _____ de 2005.

El (la) que suscribe _____ propietario

(a) o representante del propietario, con domicilio _____

por este medio autorizo que mi perro (a) _____ de _____ edad, que presenta linfosarcoma en fase final sea incluido como donación desde este día para la investigación “Determinación de la Seguridad y Distribución de un Vector Adenoviral para la Terapia Génica en Perros con Linfosarcoma Espontáneo”, que llevará a cabo el Dr. Luis Núñez Ochoa, quien se hará responsable por el bienestar de mi mascota hasta la eutanasia.

He recibido la información completa y la explicación del desarrollo de la investigación directamente del Dr. Núñez, que se realizará bajo rigurosa ética y cuidado del animal así como el impacto en la búsqueda de vías de administración de vectores adenovirales para la aplicación en oncología tanto de humanos como en animales.

Firma del propietario o representante

Anexo 2 (a).

HOJA DE SEGUIMIENTO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre		Expediente N°	
Especie		Raza	
Edad		Sexo	

Sección Responsable		Investigador (a)	Dr. Luis Núñez Ochoa
Residente		Para comunicación	
Interno (a)		Estancia	

Nombre del proyecto	Determinación de la seguridad y distribución de un vector adenoviral para la terapia génica en perros con linfosarcoma espontáneo.
---------------------	---

Actividades	8	10	12	14	16	18	20	22	24	2	4	6
Día 1: (fecha)												
Examen físico												
Jaula limpia y seca	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Determinar FC												
“ FR												
“ Temperatura												
Estado de hidratación												
Ofrecer alimento												
Reportar si come												
Ofrecer agua												
Reportar si bebe												
Sacar a caminar												
Reportar si												
<i>Defeca</i>												
<i>Orina: Recolectar</i>												
Ayuno a partir de												
Toma de muestras												
<i>Otras indicaciones</i>												
Tomar placas de tórax y abdomen VD y L-L especificando el número de caso de este proyecto												
La orina debe tener identificación y hora de colección												
Reportar cualquier manifestación clínica por favor.												

Anexo 2 (b).

HOJA DE SEGUIMIENTO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre		Expediente N°	
Especie		Raza	
Edad		Sexo	

Sección Responsable		Investigador (a)	Dr. Luis Núñez Ochoa
Residente		Para comunicación	
Interno (a)		Estancia	

Nombre del proyecto	Determinación de la seguridad y distribución de un vector adenoviral para la terapia génica en perros con linfosarcoma espontáneo.
---------------------	---

Actividades	8	10	12	14	16	18	20	22	24	2	4	6
Día 2: (fecha)												
Jaula limpia y seca	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Determinar FC												
“ FR												
“ Temperatura												
Estado de hidratación												
Ofrecer alimento												
Reportar si come												
Ofrecer agua												
Reportar si bebe												
Sacar a caminar												
Reportar si												
Defeca												
Orina: Recolectar												
Ayuno a partir de												
Toma de muestras												
Otras indicaciones												
	La orina debe tener identificación y hora de colección											
	Reportar cualquier manifestación clínica por favor.											

Anexo 2 (c).

HOJA DE SEGUIMIENTO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre		Expediente N°	
Especie		Raza	
Edad		Sexo	

Sección Responsable		Investigador (a)	Dr. Luis Núñez Ochoa
Residente		Para comunicación	
Interno (a)		Estancia	

Nombre del proyecto	Determinación de la seguridad y distribución de un vector adenoviral para la terapia génica en perros con linfosarcoma espontáneo.
---------------------	---

Actividades	8	10	12	14	16	18	20	22	24	2	4	6
Día 3: (fecha)												
Jaula limpia y seca	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Determinar FC												
“ FR												
“ Temperatura												
Estado de hidratación												
Ofrecer alimento												
Reportar si come												
Ofrecer agua												
Reportar si bebe												
Sacar a caminar												
Reportar si												
<i>Defeca</i>												
<i>Orina: Recolectar</i>												
Ayuno a partir de												
Toma de muestras												
Eutanasia y necropsia												
<i>Otras indicaciones</i>												
La orina debe tener identificación y hora de colección												
Reportar cualquier manifestación clínica por favor.												