

Transferencia génica hepática
hidrodinámica en modelos de
cerdo *in vivo* y segmento
humano *ex vivo*

TESIS DOCTORAL
LUIS SENDRA GISBERT



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

FACUTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Valencia, Abril de 2015



DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

D. Salvador F. Aliño Pellicer, Catedrático de Farmacología de la Universitat de València, Dña. María José Herrero Cervera, Doctora en Ciencias Biológicas del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y D. Rafael López Andújar, Doctor en Medicina y Cirugía del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y profesor asociado del Dpto. de Cirugía de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el Ldo. Luis Sendra Gisbert, titulado “Transferencia génica hepática hidrodinámica en modelos de cerdo in vivo y segmento humano ex vivo”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado en la Universitat de València en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, a 21 de Abril de 2015

D. Salvador F. Aliño Pellicer Dña. María José Herrero Cervera

D. Rafael López Andújar

AGRADECIMIENTOS

Durante el periodo de realización de mi tesis han sido muchas las personas que de manera directa e indirecta me han ayudado tanto a nivel profesional como personal y, por lo tanto, les debo las gracias:

A Salvador Aliño, Salva muchas gracias por ser mi mentor y por tus enseñanzas a todos los niveles. Gracias por inculcarme la pasión por la terapia génica que nos permite continuar trabajando aun cuando vienen mal dadas.

A María José Herrero, muchísimas gracias por tu apoyo, más allá de lo meramente profesional. Gracias por tu predisposición permanente a ayudarme en todo. Además de tu imprescindible trabajo como directora en la tesis, tu cariño y tus abrazos me han dado mucha fuerza cuando lo he necesitado.

A Rafael López Andújar, muchas gracias por confiar en mí y haber codirigido mi tesis. Sin tu ayuda, gran parte del desarrollo de la misma hubiera sido imposible.

Quiero agradecer también el trabajo de todas las personas que han permitido el desarrollo de la tesis. Gracias a la Unidad de Radiología y a la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Gracias también al Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Gracias a los servicios de Animalario de la Universitat de València y del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, en especial a Inmaculada Noguera y Ana Díaz por su trabajo y su ayuda a lo largo de toda la tesis.

También quiero dar las gracias a toda la gente del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UV que tan bien me ha tratado. A Mamen Arce, por prestarme siempre su asesoramiento y ayuda, aun estando de baja. A mis compañeros de otros grupos, a Paula Escudero, a Ghassan, gracias por los buenos momentos. A mi amigo Haryes, se te echa de menos.

Muchas gracias también a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio de Terapia Génica por haber hecho el día a día más ameno. A Ana Montilla, por iniciarme en el trabajo del laboratorio y a María Sánchez, Maruja, por demostrar que con esfuerzo y voluntad todo se puede y por las tertulias tan entretenidas y educativas que hemos tenido en el laboratorio.

A mi Antoniet, Antonio Miguel, has sido un pilar fundamental para continuar trabajando en el laboratorio cada día. Empezamos siendo compañeros y, con el tiempo, se ha forjado una gran amistad entre nosotros.

Infinitas gracias a mis amigos y toda mi familia por su apoyo permanente. A mi “uela”, por ayudarme a tener una vida más fácil. A mis tíos Luisa y Julio, por vuestro apoyo diario, por vuestros consejos y por alentarme a hacer cosas que puedan marcar la diferencia. Ximet, gracias por estar tan cerca desde cualquier parte del mundo. A mi padre, papá eres mi referente, un ejemplo de tenacidad y honradez, veo y agradezco lo que haces cada día por mí.

A María, gracias por tu paciencia y tu cariño. Me haces feliz todos y cada uno de los días que estás a mi lado. Sin ti nada sería posible.

Esta tesis es para ti mamá, siempre estás presente en mis pensamientos.

A todos, mi agradecimiento más sincero.

ÍNDICE

Hidrofección hepática no viral

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	13
1. La terapia génica	15
2. Estrategias de terapia génica	16
3. La terapia génica en la clínica	19
4. Transferencia hidrodinámica de ADN desnudo	24
5. Dianas terapéuticas	29
5.1 Patologías hereditarias: deficiencia en alfa-1-antitripsina	29
5.2 Patologías adquiridas: entornos proinflamatorios	31
6. Modelos experimentales	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Producción del plásmido	43
1.1. Bacterias para la amplificación del plásmido	43
1.2. Transformación bacteriana por choque térmico	43
1.3. Crecimiento bacteriano	43

Hidrofección hepática no viral

1.4. Extracción de plásmido	44
2. Plásmidos	44
2.1. eGFP	44
2.2. hAAT	44
2.3. hIL10	44
3. Animales	45
3.1. Cerdos	45
3.2. Ratones	46
4. Procedimiento quirúrgico de hidrofección	46
4.1. Equipamiento quirúrgico	46
4.2. Técnica quirúrgica	47
4.3. Transferencia génica a hígado de cerdo <i>in vivo</i>	49
5. Procedimiento de cateterismo para la hidrofección	50
5.1. Cerdos	50
5.1.1. Material empleado para la cateterización	50
5.1.2. Procedimiento endovascular	50
5.1.3. Transferencia génica a hígado de cerdo <i>in vivo</i>	53
5.2. Segmentos hepáticos humanos	54
5.2.1. Material empleado para la cateterización	54
5.2.2. Segmentos hepáticos	54
5.2.3. Transferencia génica a segmento hepático humano <i>ex vivo</i>	55

6. Ratones	56
6.1. Material empleado para la inyección	56
6.2. Transferencia génica a hígado de ratón <i>in vivo</i>	56
7. Análisis cuantitativo del ADN y ARN por PCR y RT-PCR	57
7.1. eGFP	57
7.2. hAAT	59
7.3. hIL10	60
8. Determinación de proteína	61
8.1. eGFP	61
8.1.1. Microscopía de fluorescencia	61
8.1.2. Inmunohistoquímica	61
8.1.3. ELISA	61
8.2. hAAT	63
8.2.1. Western blot	63
8.2.2. ELISA	64
8.2.3. Inmunohistoquímica	65
8.3. hIL10	66
8.3.1. ELISA	66
9. Expresión de los resultados moleculares	67
9.1. Índices	67
9.2. Actividad intrínseca de transcripción	68
10. Análisis estadístico de los datos	69
11. Determinación de transaminasas en cerdos	70
12. Síntesis de las nanopartículas de oro	71
13. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	71

RESULTADOS	73
1 Transferencia génica hepática de cerdo vascularmente estanco mediante cirugía <i>in vivo</i> empleando el gen marcador eGFP	75
1.1 Procedimiento de transferencia	75
1.1.1 Modelo de perfusión anterógrada	77
1.1.2 Modelo de perfusión retrógrada	77
1.2 Confirmación de la seguridad del procedimiento de cierre vascular completo del hígado <i>in vivo</i> mediante la monitorización de las constantes vitales del animal	78
1.3 Confirmación de la seguridad del procedimiento de hidrofección mediante la determinación de transaminasas hepáticas	81
1.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de perfusión (flujo y sentido de inyección) para la transfección del gen eGFP	83
1.4.1 Entrega aparente del gen	85
1.4.2 Transcripción del gen en tejido hepático	86
1.4.3 Presencia de la proteína eGFP en tejido hepático	88
1.4.4 Actividad intrínseca de transcripción del gen y elección de condiciones óptimas de eficiencia	89

2	Estudio de la eficiencia de transfección del procedimiento quirúrgico utilizando el gen humano hAAT, con interés terapéutico	91
2.1	Entrega génica en tejido hepático	92
2.2	Concentración de la proteína hAAT en plasma	93
2.3	Transcripción del gen en tejido hepático	95
2.4	Presencia de la proteína hAAT en tejido hepático	96
2.4.1	Medida semicuantitativa: western blot	97
2.4.2	Medida cuantitativa: ELISA	98
3	Transferencia génica del gen hAAT, en cerdo mediada por cateterismo	100
3.1	Procedimiento de cateterismo abierto	100
3.2	Procedimiento de cateterismo cerrado	102
3.3	Determinación de AST y ALT en sangre	105
3.4	Análisis molecular	106
3.4.1	Entrega génica en tejido hepático	107
3.4.2	Concentración de la proteína hAAT en plasma	108
3.4.3	Transcripción del gen en tejido hepático	110
3.4.4	Presencia de la proteína hAAT en tejido hepático	111
3.4.4.1	Medida semicuantitativa: western blot	111
3.4.4.2	Medida cuantitativa: ELISA	113

3.4.4.3	Presencia y distribución de la proteína en tejido por inmunohistoquimia	115
3.5	Eficacia comparativa de la transferencia génica mediada por catéter y cirugía en cerdo con respecto a los modelos de referencia: ratón transfectado y segmento hepático humano	117
3.5.1	Proceso de decodificación del gen hAAT y exportación de la proteína	117
3.5.2	Estudio dosis-respuesta del proceso de decodificación en el modelo gold standard (ratón)	121
4	Distribución de nanopartículas de oro (4 y 15 nm) en el tejido hepático tras inyección hidrodinámica	123
5	Transferencia génica (eGFP) a segmento hepático humano vascularmente estanco procedente de resección quirúrgica	128
5.1	Procedimiento de transferencia	128
5.2	Condiciones óptimas de perfusión (flujo y sentido de inyección) para la transferencia del gen marcador eGFP	131
5.2.1	Entrega génica en tejido hepático	131
5.2.2	Transcripción del gen en tejido hepático	132
5.2.3	Presencia de la proteína eGFP en tejido hepático	134

5.2.4	Actividad intrínseca de transcripción del gen y elección de condiciones óptimas de eficiencia	137
6	Transferencia del gen humano hIL10 a segmento hepático humano vascularmente estanco, utilizando las condiciones óptimas establecidas con eGFP	139
6.1	Entrega génica en tejido hepático	139
6.2	Transcripción del gen en tejido hepático	140
6.3	Presencia de la proteína hIL10 en tejido hepático	142
	DISCUSIÓN	145
	Futuro de nuestra investigación	174
	CONCLUSIONES	177
	BIBLIOGRAFÍA	183

Hidrofección hepática no viral

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Analysys of Variance (Análisis de la Varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
Au	Oro
CMV	Citomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fr	French (unidad de medida del diámetro, 1Fr = 1/3 mm)
Fw	Forward
G	Gauge (unidad de medida del diámetro, 19.5 G aprox 1mm)
hAAT	Human alpha-1-antitrypsin (alfa-1-antitripsina humana)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico)
hIL10	Human interleukin 10 (interleuquina-10 humana)
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LB	Luria-Bertani broth
M	Molar
mEq	Miliequivalentes
Nps	Nanopartículas
p3C	Plásmido poly-III con promotor del citomegalovirus
PBS	Phosphate buffered saline

Hidrofección hepática no viral

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer (tampón de ensayo de radioimmunoprecipitación)
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
Rv	Reverse
SCSIE	<i>Servei central de support a la investigació experimental (UV)</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i> (temperatura de fusión)
TEM	Transmission electron microscopy (microscopía electrónica de transmisión)
WB	Western blot

INTRODUCCIÓN

Hidrofección hepática no viral

INTRODUCCIÓN

1 La terapia génica

La terapia génica es una estrategia terapéutica que pretende utilizar ácidos nucleicos, en cualquiera de sus formas, como fármaco para el tratamiento temporal o permanente de patologías hereditarias o adquiridas [1]. Las definiciones desde un punto de vista regulatorio de estos medicamentos se encuentran en el Reglamento (CE) N° 1394/2007 y en la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo. Básicamente se establece que:

“Un medicamento de terapia génica es un medicamento biológico con las características siguientes: a) incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica; b) su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia”.

La terapia génica consiste en la transferencia, mediada o no por vector, de un gen con interés clínico a un órgano o tejido diana de un paciente. La intención es que el gen alcance las células diana con la suficiente disponibilidad molecular para que la maquinaria de decodificación pueda producir la proteína que codifica [2]. La correcta producción de la proteína codificada por el gen transferido permitirá: incorporar una función nueva en la célula, recuperar una función perdida o

disminuida, inhibir o modular una función exacerbada o editar el genoma para corregir la producción de una proteína defectuosa.

2 Estrategias de terapia génica

Para realizar la transferencia génica existen distintas alternativas. Dependiendo del recurso utilizado en el procedimiento, la terapia génica se clasifica en viral y no viral.

La terapia génica viral utiliza un vector viral para llevar el ADN de interés al interior de la célula diana [3]. Este vector viral consiste en la secuencia de un virus, integrativo o no, a la que se le han eliminado las secuencias responsables de su patogenicidad (relacionadas con la capacidad replicativa) y son sustituidas por el gen de interés (gen terapéutico). Del vector viral, se aprovecha su capacidad para introducirse en el interior de la célula y utilizar la maquinaria de decodificación de ésta para traducir su genoma, de igual manera que lo haría el gen insertado. La terapia génica viral presenta las siguientes ventajas:

- a) Media una transferencia más eficiente del gen,
- b) La administración puede ser sistémica puesto que la estructura del virus protege al gen de los factores adversos presentes en el torrente sanguíneo,
- c) Permite diseñar terapias permanentes (utilizando virus con capacidad de integrarse en el genoma huésped, como los retrovirus [3]) o temporales (utilizando virus no integrativos, como los adenovirus),
- d) Es posible seleccionar el tipo celular diana puesto que algunos virus presentan tropismos específicos.

Sin embargo, también tiene unos inconvenientes a tener en cuenta:

- a) Algunos tipos de virus son capaces de inducir reacciones inmunológicas intensas, limitando la repetición de dosis (especialmente en vectores adenovirales);
- b) No siempre se conoce la especificidad del lugar del genoma huésped donde los virus integrativos se insertan, pudiendo alterar la función celular normal (mutagénesis insercional, transformación tumoral);
- c) Existe la posibilidad, aunque improbable, de que las partículas virales desprovistas de capacidad infectiva, la recuperen por recombinación genética, lo que supone un riesgo potencial en su uso en la práctica clínica.

La terapia génica no viral consiste en la entrega de ADN por mediación de un vector no viral [4, 5, 6] o la entrega de ADN desnudo [7], utilizando procedimientos físicos. Se han diseñado diferentes tipos de vectores no virales con la intención de proteger el ADN entregado de la degradación ejercida por las nucleasas y otros elementos del torrente sanguíneo y facilitar así la entrada del ADN (con carga negativa) a la célula a través de sus membranas lipídicas, cargadas también negativamente. Entre los diferentes modelos de vector no viral se encuentran: a) los liposomas, que se forman por inclusión de las moléculas de ADN en el interior de capas lipídicas concéntrica y que son capaces de proteger el gen y facilitar la internalización por endocitosis y/o fusión con la membrana celular para su liberación en el interior de la célula [6, 8], y b) los poliplejos [6, 9], que utilizan polímeros biodegradables

y consiguen proteger totalmente el ADN de la degradación ejercida por las ADNasas. El uso de lípidos o polímeros catiónicos permite la formación de complejos con el ADN (lipoplejos y poliplejos, respectivamente) y facilita su internalización celular. A pesar de las ventajas de los vectores no virales, su utilidad es limitada debido a su baja eficiencia de transfección y a que presentan dificultades de formulación para su utilización clínica. La eficiencia en experimentos *in vitro* ha resultado ser muy superior a la observada *in vivo*. Además, en algunas ocasiones podrían inducir cierta respuesta inmunitaria en el paciente. Debido a que la terapia génica viral ofrece buena eficiencia de transferencia pero existe el riesgo potencial de inducir una respuesta inmunitaria intensa, o incluso una recuperación de la infectividad del virus, y la terapia génica no viral mediada por vector no ofrece unas ventajas palpables, se han desarrollado procedimientos físicos de transferencia de ADN desnudo que resultan eficientes y seguras. Existen diferentes alternativas para esta estrategia, entre las que destacan:

- a) Electroporación, que consiste en incrementar la permeabilidad de las membranas utilizando pulsos eléctricos [6, 10, 11]. Mejora la eficiencia de transferencia pero tiene una aplicación más limitada al tejido muscular;
- b) Sonoporación, consiste en la aplicación de ultrasonidos sobre un tejido biológico, lo que consigue la formación de burbujas que crean una agitación capaz de desestabilizar transitoriamente las membranas celulares y así facilitar la entrada del material génico [6, 12];

- c) Magnetofección, que consiste en aplicar un campo magnético tras la transferencia del gen con alguna partícula metálica para dirigir el producto al interior del tejido. No ha mostrado mejoras sustanciales [13, 14];
- d) Microproyectiles, consisten en la inyección de partículas a gran velocidad. Se utilizan específicamente en territorio muscular [15-17];
- e) Transferencia génica hidrodinámica, en la que el vehículo del gen es una solución salina acuosa isotónica. Los mediadores de la transferencia génica son los cambios en la permeabilidad celular inducidos por la inyección intravascular de la solución acuosa de ADN (hidrofección). Ha resultado ser uno de los procedimientos más prometedores y con mayor potencial de aplicación en distintos órganos [18, 19].

3 La terapia génica en la clínica

Desde que se aprobara el primer ensayo clínico en pacientes empleando la terapia génica en 1989, el número de estos ensayos no ha parado de crecer [20], con pequeñas fluctuaciones interanuales, hasta alcanzar un máximo de 120 ensayos en 2008 y un número total acumulado de 2076 ensayos clínicos (figura 1) en terapia génica en el mundo [21]. A pesar de que el número de ensayos aprobados realizados en España no supera el 1 % (tabla 1) del total llevados a cabo, esta tendencia indica el creciente interés de la terapia génica como estrategia terapéutica.

Hidrofección hepática no viral

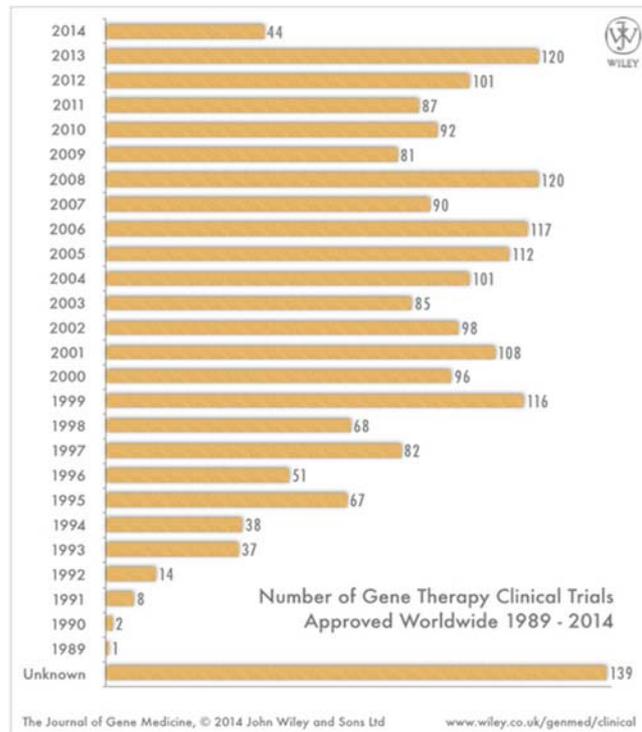


Figura 1. Ensayos clínicos de terapia génica aprobados en el mundo. En la figura se muestran el número de ensayos clínicos empleando terapia génica que se han declarado y aprobado cada año en el mundo desde que se aprobó el primero en 1989 hasta Junio de 2014 (la base de datos se actualiza cada año en Junio). Fuente: www.wiley.co.uk/genmed/clinical.

Spain	17	0.8
Sweden	10	0.5
Switzerland	50	2.4
Taiwan	1	0
Uganda	1	0
UK	206	9.9
USA	1312	63.2
Multi-country	80	3.9
Total	2076	

Tabla 1. Ensayos clínicos de terapia génica aprobados en España. En la tabla se indica el número de ensayos clínicos de terapia génica declarados y aprobados (columna central), que se han realizado en España y otros países cercanos alfabéticamente (columna de la izquierda) y la incidencia de estos con respecto al total en porcentaje (columna de la derecha) desde 1989 hasta Junio de 2014. Fuente: www.wiley.co.uk/genmed/clinical.

Este creciente uso de la terapia génica se hizo posible debido al amplio desarrollo de las construcciones génicas empleando genes distintos según la aplicación terapéutica. De entre los más empleados, destaca el empleo de genes con la intención de modular la respuesta inmune bien activándola o reprimiéndola. Las estrategias de terapia génica no viral más empleadas en los ensayos clínicos han sido la lipofección y la entrega de ADN desnudo, ya que son los procedimientos más seguros. Sin embargo, cuando se cruza la búsqueda de los ensayos clínicos aprobados en los que se emplea el ADN desnudo para el tratamiento de enfermedades hereditarias monogénicas, sólo encontramos 6 estudios, mientras que empleando como producto terapéutico un gen que codifica una citoquina, sólo uno ha sido aprobado hasta la fecha. En los ensayos clínicos, se han utilizado principalmente los vectores virales, sumando más del 70 % del

total. Los más empleados han sido el adenovirus, por su capacidad para transportar genes de gran tamaño y expresarlos transitoriamente, y los retrovirus, que tienen la capacidad de insertar el gen en el genoma de la célula huésped, permitiendo así una expresión mantenida en el tiempo (muy útil para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias).

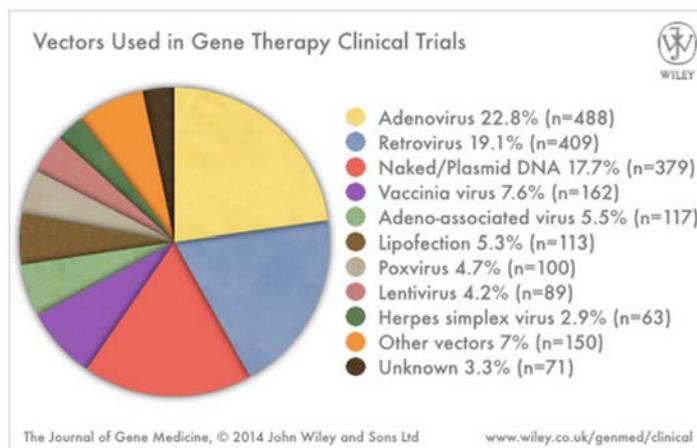


Figura 2. Vectores empleados en los ensayos clínicos de terapia génica. El gráfico muestra el uso de los diferentes vectores (virales y no virales) empleados en los ensayos clínicos que emplean terapia génica aprobados desde 1989 hasta Junio de 2014 y la incidencia de cada uno de ellos en el total de ensayos. Fuente: www.wiley.co.uk/genmed/clinical.

A pesar de las diferentes estrategias para vehiculizar el gen y el tipo de tratamiento empleados, apenas el 0,1 % del total de ensayos clínicos utilizando la terapia génica han alcanzado la fase IV.

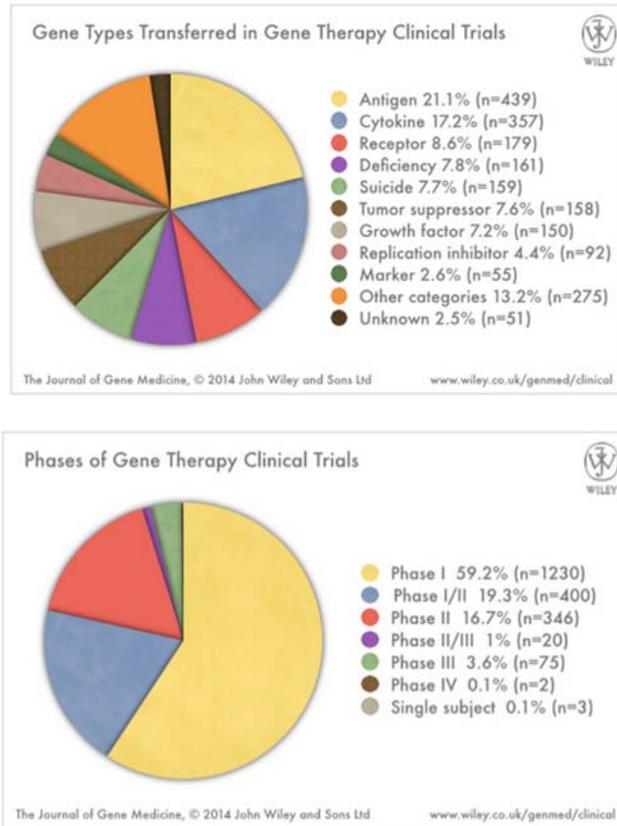


Figura 3. Tipos de genes utilizados en los ensayos clínicos de terapia clínica y las fases que alcanzan estos. El gráfico de la izquierda muestra el uso de los diferentes tipos de genes empleados en los ensayos clínicos que emplean terapia génica según la estrategia seguida aprobados desde 1989 hasta Junio de 2014. El gráfico inferior indica las fases que alcanzaron los ensayos clínicos de terapia génica aprobados desde 1989 hasta 2014. Fuente: www.wiley.co.uk/genmed/clinical.

De entre todos los procedimientos de terapia génica, el que ha resultado tener un balance beneficio/riesgo más positivo ha sido la transferencia génica hidrodinámica de ADN desnudo. Dado el elevado interés potencial de la terapia génica y el amplio campo de su aplicación en terapéutica, pensamos que se necesitaba un

estudio molecular detallado del proceso de entrega génica y la decodificación de un gen exógeno en tejido, con el fin de optimizar el procedimiento. Por ello, en la presente tesis se estudia dicho proceso en el modelo porcino *in vivo* y en tejido humano *ex vivo* con la intención de identificar las limitaciones del procedimiento y determinar si es posible superarlas.

4 Transferencia hidrodinámica de ADN desnudo

La posibilidad de expresar genes heterólogos con elevada eficacia tras la entrega de un gen desnudo fue descrita por primera vez a mediados de los años 90 [22, 23]. En el año 1999, Zhang et al. [24] y Liu et al. [25] introdujeron el procedimiento de transferencia génica hidrodinámica. El procedimiento consistía en la inyección a gran velocidad de un volumen grande (2 ml en 5-7 segundos) de solución salina conteniendo un gen de interés, a través de la vena de la cola en ratón (peso medio 20 g). La posibilidad de una transferencia génica eficiente mediante la entrega de ADN desnudo despertó un gran interés puesto que permitía expresar una proteína heteróloga utilizando un procedimiento más seguro que la terapia génica viral. Distintos grupos de investigación dedicaron sus esfuerzos a mejorar la técnica para que fuera lo más segura, eficiente y reproducible posible [26].

En la siguiente figura se muestra lo que ocurre a nivel de la circulación sinusoidal en el hepatocito antes y después de inyectar, en sentido retrógrado, una solución salina conteniendo un plásmido. La inyección de la solución génica a través de la cola alcanza el hígado en sentido retrógrado y provoca un aumento en

la presión dentro del vaso. Esto crea una distensión en la pared que permite la separación momentánea de las células endoteliales. Cuando esto ocurre, el ADN tiene facilitada su salida del vaso sanguíneo a través de los poros sinusoidales y los espacios intercelulares y alcanza el espacio de Disse. De ahí se entrega al hepatocito, en cuyo proceso, la formación masiva de vesículas endocíticas debe desempeñar un papel relevante. Este ADN debe alcanzar el núcleo del hepatocito para que su información genética pueda ser decodificada. Cuando este proceso ocurre de manera eficiente, el ADN se transcribe a ARN y éste se traduce a proteína para su liberación a la sangre (si se trata de una proteína de secreción).

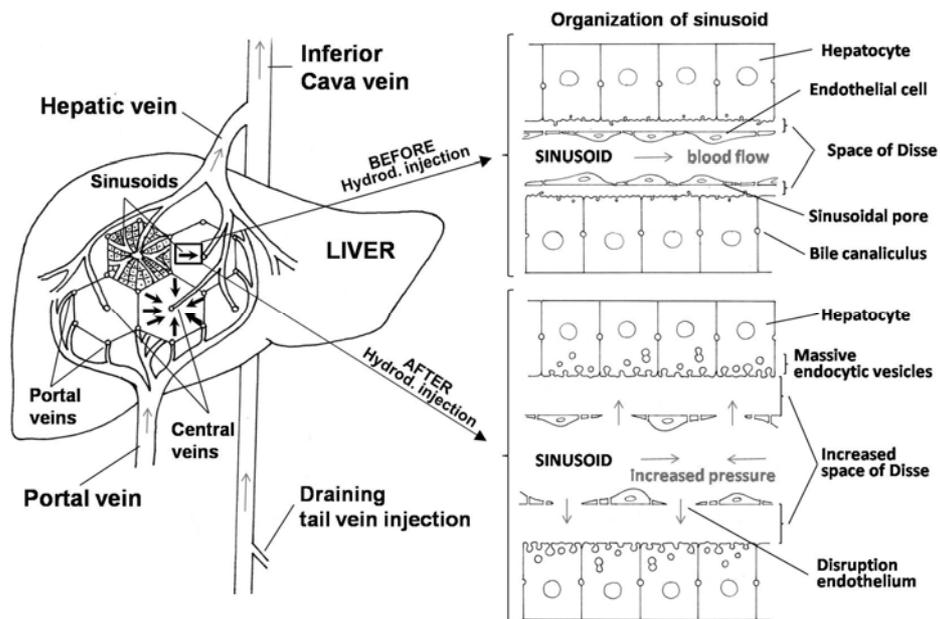


Figura 4. Representación esquemática del procedimiento de transferencia génica hidrodinámica hepática en ratón. A la izquierda se muestra el sistema vascular hepático, indicando el sentido del flujo sanguíneo. A la derecha de la imagen se puede observar la organización del sinusoides en condiciones normales (superior) y lo que ocurre tras la inyección retrógrada de una solución genética (inferior). Cuando se inyecta por la vena de la cola (sentido retrógrado) una solución conteniendo un plásmido, aumenta la presión en el interior del vaso, lo que crea una distensión del mismo y la separación de las células endoteliales. Esto permite la entrada del constructo al espacio de Disse (dilatado) y al hepatocito mediante la formación masiva de vesículas endocíticas.

Utilizando este procedimiento, nuestro grupo consiguió alcanzar unos niveles de expresión plasmática terapéuticos para la proteína de la alfa-1-antitripsina humana en ratón durante periodos de tiempo superiores a 6 meses [27]. En la actualidad, se están realizando experimentos de terapia génica para el tratamiento de distintas patologías en ratón con este mismo procedimiento [28-30]. La posibilidad de alcanzar concentraciones terapéuticas

mantenidas de una proteína heteróloga tras la perfusión hidrodinámica de un gen humano en ratón, impulsó a centrar los esfuerzos en desarrollar y adaptar el procedimiento en animales de mayor tamaño con la intención de trasladarlo a la clínica, ya que los cambios hemodinámicos inducidos por la inyección hidrodinámica son incompatibles con su uso en humanos. Las condiciones de perfusión que conseguían alcanzar los mejores resultados en ratón representan doblar la volemia del animal en un periodo de tiempo muy breve. El procedimiento debe ser necesariamente adaptado puesto que las condiciones hidrodinámicas empleadas en el ratón no podrían ser toleradas por animales de mayor tamaño. Las modificaciones del modelo iban generalmente encaminadas a disminuir la presión hidrodinámica sistémica. Esto se llevaba a cabo dirigiendo la transferencia génica a un único órgano diana. Se realizaron estudios en modelos animales de rata [31, 32] y conejo [33] sin conseguir obtener resultados que fueran siquiera similares a los obtenidos en ratón. Los esfuerzos más recientes se han dirigido a desarrollar modelos de perfusión hidrodinámica hepática en cerdos por tener una mayor proximidad anatómica con los humanos [34]. En el cerdo se diseñaron estrategias de transferencia mínimamente invasivas mediante la realización de cateterismos hepáticos [35, 36] que, aunque fueron seguras, no mostraron una eficiencia remarcable. Algunos autores apuntaban la posibilidad de que se necesitara una mayor presión intravascular hepática, por lo que se estudiaron distintas estrategias como bloquear el retorno venoso o inyectar la solución en condiciones hemodinámicas más exigentes. En ningún

caso se consiguieron niveles de expresión de una proteína heteróloga cercanos a los terapéuticos. Tras los diferentes trabajos realizados por varios grupos en todo el mundo, no se había conseguido alcanzar ningún resultado alentador [37-41]. No obstante, dado el enorme interés que presenta el procedimiento para ser trasladado a la clínica, es necesario realizar un estudio molecular minucioso de la eficiencia del procedimiento que confirme o refute esta posibilidad. Este análisis permitiría identificar la etapa del proceso de decodificación genética que podría estar limitando la eficacia final. Este trabajo de tesis tiene como objetivo confirmar o refutar el interés traslacional del procedimiento de transferencia génica hidrodinámica mediante el análisis molecular detallado de la entrega, transcripción y traducción del gen, así como su posterior exportación al torrente sanguíneo tanto en modelos animales *in vivo* como en modelos de tejido humanos *ex vivo*. Mediante la adaptación eficiente y segura del procedimiento de transferencia génica utilizado en ratón, se pretende encontrar las mejores condiciones de eficacia y seguridad en la transferencia génica hepática en cerdos *in vivo* y en segmentos hepáticos humanos *ex vivo*. Esta metodología permitirá comparar de manera cuantitativa la eficiencia de diferentes procedimientos para transferir un gen al hígado. Para ello se evalúan algunas alternativas que pueden mejorar la eficiencia del procedimiento, como el cierre vascular parcial o total del órgano, y también la eficiencia del procedimiento alcanzada cuando se transfiere el gen a segmentos hepáticos humanos *ex vivo*.

5 Dianas terapéuticas

Dado que la terapia génica es capaz de entregar a las células un gen funcionalmente completo, que supla una disfunción en la expresión del gen natural, presenta un gran interés para el tratamiento de las enfermedades hereditarias metabólicas [43-46], como la deficiencia en alfa-1-antitripsina [47], en la que se podría implementar el gen funcional completo.

5.1 Patologías hereditarias: deficiencia en alfa-1-antitripsina

La alfa-1-antitripsina es una proteína inhibidora de las proteasas séricas que se encarga principalmente de proteger a los tejidos frente a la acción de éstas [48]. Su función tiene especial relevancia en el tejido pulmonar, donde protege de la acción de las proteasas, manteniendo así la integridad del tejido y evitando su degradación y fibrosis. Los pacientes que la sufren pueden presentar dos variantes alélicas, que van a definir la gravedad de los síntomas. El alelo normal (PiM) se presenta en el 90 % de la población y produce la proteína normal, que se libera al torrente sanguíneo en unos niveles adecuados (0.8-1.2 mg/ml) para la realización de su función. Los pacientes con la variante alélica PiS son capaces de producir parcialmente la proteína correcta y presentan unos niveles de proteína en sangre de aproximadamente el 50-60 % de la concentración normal. Estos niveles son suficientes para que la proteína ejerza su función y los pacientes con esta variante presentan síntomas leves. Sin embargo, en los pacientes que presentan la variante alélica PiZ la proteína producida es en su mayoría defectuosa, lo que impide que

sea liberada y los niveles sanguíneos apenas superan el 10-20 % de los niveles normales. En estos casos, la concentración de proteína no es suficiente para inhibir la acción de las proteasas. Estos pacientes sufren a medio plazo alteraciones severas del tejido pulmonar, como enfisema y daño hepático, por la acumulación de la proteína en el hepatocito, entre otros síntomas. El defecto genético responsable de esta patología afecta a 1 entre 3.000-5.000 personas (se estima que existen alrededor de 100.000 personas con deficiencia en alfa-1-antitripsina en Europa y 3.4 millones en todo el mundo. Además, 161 millones de personas en el mundo tienen una copia del alelo S o Z), convirtiéndola en una de las tres enfermedades genéticas letales más frecuentes [49-51]. La deficiencia en alfa-1-antitripsina es una diana terapéutica idónea para la terapia génica y, en este sentido, ya se habían realizado diversos estudios [52] antes de la descripción del procedimiento hidrodinámico [24, 25], con resultados pobres aunque esperanzadores utilizando tanto liposomas [53-56] como vectores virales [57, 58]. Con el uso de la transferencia génica hidrodinámica se consiguió alcanzar niveles terapéuticos de la proteína en suero transitorios [59] primero, y prolongados, más tarde en ratón [27]. Debido a esta gran incidencia y a la gravedad de sus efectos, decidimos emplear el gen humano de la alfa-1-antitripsina completo para estudiar la eficiencia de la transferencia génica en los ensayos en cerdo *in vivo*. Además, al tratarse de una proteína de secreción, nos permite cuantificar la presencia plasmática de la proteína humana, completando el estudio del proceso de decodificación y expresión de la proteína.

La terapia génica también puede jugar un papel muy importante en el tratamiento de diferentes patologías adquiridas. Nosotros pretendemos evaluar su posible aplicación en situaciones en las que se requiere la inmunomodulación en entornos proinflamatorios, tales como el trasplante hepático.

5.2 Patologías adquiridas: entornos proinflamatorios

En los ensayos de transferencia génica hidrodinámica a segmentos hepáticos humanos *ex vivo*, se pretende identificar de manera rápida la expresión intracelular de la proteína eGFP (no se secreta) por técnicas de microscopía. Una vez evaluada la eficiencia del procedimiento, se pretende estudiar la eficiencia de la expresión de un gen con potencial terapéutico para abarcar un abanico más amplio de patologías y evaluar el potencial interés de la terapia génica en distintos escenarios. El control de la respuesta inflamatoria es una aplicación clínica que podría tener un gran interés en diferentes entornos tales como el trasplante de órganos o la persistencia de una respuesta inflamatoria exacerbada en algún órgano. Por ello, decidimos usar un gen con capacidad inmunomoduladora como la citoquina interleuquina-10. Esta proteína tiene efectos pleiotrópicos en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria [60]. Es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos Th1 y de citoquinas proinflamatorias. Por sus efectos, la IL-10 podría ser utilizada en diferentes escenarios como modular la respuesta inmunitaria exacerbada en casos de enfermedades autoinmunes. Los beneficios de la utilización de

dicha proteína han sido demostrados en enfermedades autoinmunes como la psoriasis [61] o el Crohn, mediante ensayos clínicos, empleando bacterias capaces de expresar la IL-10 humana [62]; situaciones de inflamación crónica [63]; mejorar el proceso de recuperación funcional del miocardio tras un infarto agudo [64]; o para mejorar la respuesta de rechazo tras el trasplante de órganos sólidos, tanto en corazón [65] como en hígado [66]. La expresión de concentraciones adecuadas de la proteína IL10 podría controlar local y transitoriamente el entorno inflamatorio creado por el hígado trasplantado, actuando en concomitancia con los medicamentos inmunosupresores clásicos. De este modo, se favorecería la aceptación del órgano trasplantado en los primeros días después del trasplante, momento más importante en la respuesta inflamatoria de rechazo, ya que ha quedado demostrado que si no se controla la respuesta inflamatoria al inicio de la misma, posteriormente resulta muy difícil ejercer un efecto sobre ella [67, 68].

6 Modelos experimentales

En la presente tesis doctoral hemos empleado tejido hepático procedente de 3 especies animales diferentes: ratón, como patrón oro del procedimiento de transferencia génica hidrodinámica; cerdo, como modelo experimental para intervenciones de transferencia génica hepática *in vivo* con potencial traslacional; y humano, para ejercer de control de referencia con el que establecer los niveles de expresión basal de la proteína alfa-1-antitripsina (hAAT) en tejido y como órgano diana para la

transferencia del gen interleuquina-10 (hIL10). La transferencia génica en ratón se lleva a cabo con el procedimiento hidrodinámico. Se realiza la inyección de la solución génica en la vena de la cola bajo las condiciones descritas con anterioridad por nuestro grupo [27] y que median niveles terapéuticos de la proteína hAAT en plasma. La finalidad última de este trabajo consiste en confirmar o refutar la idea de que la hidrofección es un método de transferencia génica con potencial para ser trasladada a la práctica clínica. Por este motivo, se debe utilizar un modelo animal lo más cercano posible al humano, como es el cerdo, y procedimientos de transferencias que puedan ser aplicables en pacientes. Diferentes trabajos de investigación llevados a cabo en los últimos años demostraron que, posiblemente debido a la elasticidad del hígado [38], el cierre vascular del órgano podía aportar beneficios en la hidrofección por el aumento de presión intrahepática [40]. Con este fin, desarrollamos un procedimiento quirúrgico porcino [69] basado en practicar una laparotomía al animal y, mediante ligaduras, excluir el hígado de la vascularización. Tras el cierre vascular, se transfiere el gen al hígado estanco mediante la inyección en sentido retrógrado de la solución génica, que ha demostrado mediar una mayor eficiencia. Ya ha sido descrito con anterioridad que era posible excluir el hígado de la circulación sanguínea durante un periodo de hasta 20 minutos sin daño para el animal [70, 71]. En nuestros experimentos, este periodo nunca es superior a los 9 minutos. Este procedimiento, a pesar de ser invasivo, es utilizado en la clínica como parte de la intervención del trasplante hepático. Con esta estrategia se consigue cerrar por completo el

hígado y detectar cualquier posible fuga del volumen inyectado. Se comprueba que el procedimiento es realizable y seguro y el animal se recupera en un breve periodo de tiempo y se evalúa la eficiencia del procedimiento, que resulta ser notable en el tejido. Una vez confirmado este hecho, se desarrollan otros 2 procedimientos intervencionistas (mediante el procedimiento de Seldinger [72]) de transferencia génica, que resultan menos cruentos y de más fácil traslación clínica. El primer procedimiento (al que llamamos “cateterismo cerrado”) consiste en la exclusión venosa del hígado mediante el uso de catéteres e introductores con balón. Este procedimiento es el más cercano a la cirugía. Los catéteres cierran la circulación venosa hepática pero se mantiene la arteria hepática abierta. El segundo modelo intervencionista de transferencia génica (llamado “cateterismo abierto”) es el menos invasivo de los 3 y consiste en la perfusión de la solución génica a través de un catéter con balón (para impedir el retorno de la solución) en un único lóbulo del hígado. En este modelo no se excluye la circulación en el hígado y no se afectan las condiciones hemodinámicas del animal.

El análisis molecular detallado de todo el proceso de decodificación genética en cada estrategia de transferencia y en el ratón transferido mediante el procedimiento más exitoso, permite comparar el comportamiento de cada modelo e identificar las causas de la ineficiencia.

En los segmentos hepáticos humanos la circulación ya está cerrada debido a la intervención quirúrgica a la que se somete el hígado con anterioridad a la recepción de la pieza. La transferencia

génica se realiza por inyección venosa retrógrada a través de una vena suprahepática, tal y como se describe en un trabajo previo de nuestro grupo [73]. Se trata de un tejido de gran valor en nuestros experimentos porque es el material biológico sobre el que se pretende trabajar una vez llevado el procedimiento de hidrofección a la clínica. No existen trabajos que describan el uso de tejido humano para el estudio de la eficiencia de la hidrofección a excepción de los de nuestro grupo (empleando el gen eGFP). En la presente tesis se emplea tejido humano para evaluar la eficiencia del procedimiento de hidrofección de un gen humano con interés terapéutico en múltiples patologías en un tejido que, *a priori*, cuenta con todos los elementos necesarios para su correcta expresión.

Los resultados obtenidos muestran que, utilizando el procedimiento de cateterismo mínimamente invasivo, la transferencia génica ocurre aunque con una eficiencia de entrega baja. Sin embargo, el gen entregado se transcribe y traduce en el tejido en unos niveles similares a los observados en genes con una tasa de expresión intermedia. Se observó también que el cierre vascular del órgano aporta beneficios. A medida que el cierre vascular fue más completo (cateterismo abierto < cateterismo cerrado < cirugía), la tasa de traducción de la proteína en tejido fue mayor.

Hidrofección hepática no viral

HIPÓTESIS

La hipótesis de la presente tesis consiste en que es posible desarrollar un procedimiento seguro y eficaz de transferencia génica hidrodinámica utilizando unas condiciones de volumen y flujo de perfusión compatibles con la práctica clínica, abriendo así el camino a una nueva vía terapéutica con potencial aplicación en multitud de patologías.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es confirmar el interés clínico traslacional de la transferencia génica hidrodinámica en hígado, basado en el análisis molecular del proceso de decodificación de la información genética del gen transferido.

Los objetivos concretos son:

- 1) Establecer una metodología sistemática para el análisis molecular de la eficacia de la transferencia génica que permita la cuantificación del ADN entregado, de la transcripción del gen a ARN y de la traducción de la proteína (en número de copias por célula normalizada)

- 2) Evaluar la eficacia de un procedimiento de transferencia génica hidrodinámica hepática mínimamente invasivo, mediante el cateterismo *in vivo* en cerdo (cateterismo abierto) de una solución conteniendo el gen de la alfa-1-antitripsina (hAAT)

- 3) Evaluar los beneficios del cierre vascular del hígado durante la transferencia en la eficiencia final del proceso, mediante el empleo

de dos modelos de transferencia génica (utilizando el gen hAAT) hepática en cerdo *in vivo*:

- a) cateterismo cerrado (cierre parcial), con el cierre simultáneo de la vena cava supra e infrahepática mediante catéteres con balón implantados a través de las venas yugular y femoral, y el cierre de la vena porta intrahepática mediante un cateterismo transhepático
- b) cirugía (cierre completo), con un aislamiento vascular total del hígado con el cierre de la arteria hepática y de las venas cava (supra e infrahepática) y porta, llevado a cabo tras practicar una laparotomía al animal

4) Comparar el comportamiento en la decodificación del gen entre los diferentes modelos y con los controles siguientes:

- a) transferencia génica hidrodinámica en ratón, en el que se consiguió alcanzar una concentración plasmática terapéutica de la proteína hAAT, codificada por el gen transfectado, durante periodos de tiempo superiores a 6 meses
- b) muestras de tejido hepático humano, puesto que contiene todos los elementos necesarios para decodificar el gen humano de la manera más eficiente

5) Estudiar la eficiencia de la transferencia génica en segmentos hepáticos humanos *ex vivo* utilizando un gen marcador (proteína fluorescente verde potenciada, eGFP) y un gen humano con interés terapéutico para el trasplante de órganos (interleuquina-10, IL-10)

6) Determinar las barreras físicas que ofrece el tejido hepático, en las diferentes especies, al acceso de partículas de oro coloidal de diámetro conocido (4 y 15 nm) al interior de los hepatocitos mediante la inyección hidrodinámica y posterior observación por microscopía electrónica de la distribución de éstas en el tejido hepático.

Hidrofección hepática no viral

MATERIAL Y MÉTODOS

Hidrofección hepática no viral

1 Producción del plásmido

1.1 Bacterias para la amplificación del plásmido

Se utilizan bacterias *E. coli* químicamente competentes de alta eficiencia (Life technologies, Madrid, España)

1.2 Transformación bacteriana por choque térmico

Para la transformación de bacterias se sigue el procedimiento del choque térmico. Básicamente, las bacterias competentes (50 μ l) se incuban en presencia del plásmido (100-400 ng) y la solución se somete a varios pasos de frío-calor (30' hielo, 3' a 42°C y 30' hielo) para hacer más permeable la membrana a la entrada del plásmido. A continuación, estas bacterias se crecen en placa durante 24h con un medio selectivo (LB- agar 1,5%+ antibiótico de selección). A partir del cultivo en placa se selecciona un clon, para asegurarnos de que todas ellas provienen de la misma célula transformada inicial. Este clon lo cultivamos en medio líquido LB broth (Lennox) (Laboratorios Conda, Madrid, España) durante 24h. Estas bacterias transformadas se conservan a -20°C en solución de criopreservación.

1.3 Crecimiento bacteriano

Para la amplificación del plásmido, se crecen las bacterias en medio líquido LB broth (Lennox) (Laboratorios Conda, Madrid, España), durante un tiempo aproximado de 24h. Para comprobar el nivel de crecimiento bacteriano se mide la absorbancia del cultivo, que deberá estar entre 1.4-1.8 unidades de densidad óptica.

1.4 Extracción de plásmido

Para la extracción y purificación del plásmido se usa EndoFree®Plasmid Purification (Qiagen®, Barcelona, España) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de plásmido obtenido se cuantifica por espectrofotometría.

2 Plásmidos

2.1 eGFP

El plásmido p3C-eGFP (6.45 kb), conteniendo el ADN complementario de la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) y controlado por el promotor del cytomegalovirus (CMV), se construyó a partir del clonaje de eGFP en el lugar de restricción *HindIII* del pCDNA3 (Invitrogen, Barcelona, España), previamente escindido del vector plasmídico peGFP (4.7 kb) (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Francia).

2.2 Alfa-1-antitripsina

El plásmido pTG7101 (18.6 kb) contiene un fragmento de 16.5 kb conteniendo el DNA genómico de la alfa-1-antitripsina humana, clonado en el sitio *SaII* del plásmido PolyIII-I. Contiene además 1.8 kb en la región 5' por delante del gen y 3.2 kb en la región 3', posterior al mismo.

2.3 Interleuquina-10

El plásmido p2F-hIL10 se obtiene a partir del plásmido base pVITRO2 (Invivogen, France), conteniendo el gen humano de la

interleuquina 10 (IL10). Los plásmidos basados en pVITRO2 permiten la cotransfección de dos genes simultáneamente. Para ello contienen 2 promotores humanos, el de la cadena pesada de la ferritina (FerH) y el de la cadena ligera de la misma (FerL), combinados respectivamente con los intensificadores (“enhancers”) de los virus SV40 (simian virus 40) y CMV (citomegalovirus) y con el gen de resistencia a higromicina, que permite tanto la selección de bacterias transformadas como de células eucariotas transfectadas. Para eliminar la regulación por hierro de los promotores, sus regiones 5’UTRs han sido reemplazadas por las de los genes EF1 α de ratón y chimpancé.

3 Animales

3.1 Cerdos

- **Procedimiento quirúrgico**

Los cerdos hembra (n=20), de entre 18 y 23 kg, se obtienen de una granja que abastece al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y se estabulan en espacios individuales. Los experimentos llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Hospital La Fe.

- **Procedimiento de cateterismo endovascular**

Los cerdos hembra (n=8), de 18 a 23 kilogramos, se obtienen de una granja que abastece al Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València y se estabulan individualmente. Todos los experimentos llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de

Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

3.2 Ratones

Para los experimentos de transferencia génica hidrodinámica el hígado de ratón *in vivo*, se utilizan 7 ratones C57BL/6 machos (B&K Universal Ltd). Los animales se mantienen en condiciones estándar de laboratorio y se estabulan en un número de 4 ratones por jaula. La anestesia se induce y mantiene con isoflurano (Isoflo®, laboratorios Abbott, Madrid, España; 5% y 2% respectivamente, a través de la vía inhalatoria). Todos los experimentos llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

4 Procedimiento quirúrgico de hidrofección

4.1 Equipamiento quirúrgico

Equipamiento quirúrgico para realizar una laparotomía: lazos para referenciar las estructuras vasculares (DEVON TM, COVIDIEN, Barcelona, España) y clamps para cerrar los vasos. Se utilizan tres tipos de sutura: BiosynTM 5/0 (COVIDIEN, Barcelona, España) para la vena cava, ProleneTM 6/0 (ETHICON, NJ, USA) para la vena porta y DexonTM 2/0 (COVIDIEN, Barcelona, España) para cerrar la pared abdominal. La piel del abdomen se cierra con grapas.

4.2 Técnica quirúrgica

Los cerdos son anestesiados. La anestesia se induce con ketamina (Imalgene 100, Merial Francia; 5-10 mg/kg, im), midazolam (Hospira 1 mg/ml, Madrid, España; 0.3 mg/kg, im) y propofol (Lipuro 2%, Braun, Melsungen, Alemania; 4-6 mg/kg, iv), y se mantiene con sevoflurano (Sevorane, laboratorios Abbott, Madrid, España; 2.5%, a través de la ruta inhalatoria). Se induce la relajación muscular del animal con bromuro de vecuronio (Norcuron 10 mg; 0.08 mg/kg, iv). Para la analgesia intraoperatoria se utiliza morfina (0.4 mg/kg, iv) y para la postoperatoria, se emplea buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, Madrid, España; 0.02 mg/kg, iv). A continuación, se sitúa una vía en la vena yugular para la toma de muestras de sangre venosa periférica y un catéter en la arteria femoral para la monitorización de la presión sanguínea del animal. Se realiza una laparotomía completa, con la exposición de todos los órganos abdominales. Se expone la vena porta extrapancreática y se rodea por uno o dos lazos vasculares dependiendo del modelo de canulación llevado a cabo. La arteria hepática se referencia con una ligadura de seda. Se disecciona la vena cava inferior por encima de las venas renales y se referencia con uno o dos lazos vasculares, dependiendo del modelo de canulación empleado. La vena cava suprahepática también se rodea con un lazo vascular.

Esta técnica quirúrgica nos permite establecer dos modelos de perfusión con una exclusión vascular hepática total. En el modelo 1, la perfusión de la solución génica se lleva a cabo a través de la

vena cava únicamente (retrógrada) mientras que en el modelo 2, la perfusión se realiza a través de la vena porta (anterógrada).

La secuencia del clampaje o cierre vascular es la siguiente: primero, la arteria hepática, después la vena porta y posteriormente la vena cava infrahepática, para interrumpir la entrada de sangre en el hígado. Por último, se cierra la vena cava suprahepática para asegurar una exclusión vascular total en el hígado. En el modelo 1, la vena porta se clampa y se realiza una pequeña incisión longitudinal en la superficie anterior de la vena cava para insertar la cánula de perfusión. En el modelo 2, el proceso es similar al realizado en el modelo 1 pero clampando la vena cava y perfundiendo a través de la vena porta.

Tras la perfusión de la solución génica, el hígado se mantiene en condiciones de exclusión vascular completa durante un periodo nunca superior a 5 minutos para facilitar la entrada del plásmido a los hepatocitos. Durante este periodo, las incisiones vasculares se suturan. Transcurrido este periodo, se restituye la vascularización hepática quitando los clampajes siguiendo la secuencia inversa a la empleada para el bloqueo, liberando primero la salida de sangre del hígado.

Las funciones vitales del animal son monitorizadas continuamente durante la operación. Los cerdos se sacrifican 24 horas tras la inyección del gen eGFP (n=14) y 14 días después de la inyección del gen hAAT (n=4), con cloruro de potasio (Braun 2 mEq, 20 mEq, iv), después de la sedación. Se toman muestras sanguíneas de la vena de la oreja a las 0 horas (antes de la inyección del plásmido), 1 hora tras la inyección y 24 horas después, antes del sacrificio,

para la transferencia de eGFP. Para la transferencia del plásmido hAAT también se toman muestras en los días 2, 4, 7 y 14. En ambos casos, tras el sacrificio se extrae el hígado y se toman muestras representativas de cada uno de los lóbulos principales (8 en total) para los posteriores análisis.

4.3 Transferencia génica a hígado de cerdo *in vivo*

Se sitúa un catéter de 11 Fr en la vena cava o la vena porta dependiendo del modelo de perfusión elegido. Tras la fijación del catéter, se inyecta la solución salina conteniendo el plásmido en una concentración de 20 µg/ml. Se realizaron experimentos bajo diferentes condiciones exploratorias de flujo y volumen para definir las óptimas: 400 ml a 40 ml/s a través de las venas porta y cava simultáneamente con una conexión en Y (n=1); y 600 ml a 60 ml/s por porta y cava, simultáneamente (n=1). Sin embargo, los resultados indicaron que era recomendable bajar la exigencia hidrodinámica del procedimiento y se decidió utilizar un volumen fijo de 200 ml (lo que supone aproximadamente 1/3 del peso total del órgano en gramos de acuerdo con el peso corporal del cerdo) y unas velocidades de 10 ml/s (n=6, para eGFP) y 20 ml/s (n=6 para eGFP; n=4 para hAAT; n=2 para nanopartículas de oro).

Se toman muestras tisulares representativas (8 por hígado) de los lóbulos principales del hígado de aproximadamente 1 mm de grosor bajo condiciones estériles y se estabilizan en solución RNAlater® (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las muestras se procesan un día después para el análisis molecular y evaluar así

la eficacia de entrega, transcripción y traducción del gen transcurridas 24 horas o 14 días de la transfección.

5. Procedimiento de cateterismo para la hidrofección

5.1 Cerdos

5.1.1 Material empleado para la cateterización

- Agujas para punción de 18G
- Guías hidrofílicas y de Teflón de 0.035 pulgadas
- Introdutor de 18Fr para el acceso venoso yugular y femoral (Gore®)
- Introdutores de 5Fr y 11Fr (Cook® Birmingham, UK) para el acceso venoso portal percutáneo
- Catéteres multipropósito para angiografía de 5Fr
- Balones de angioplastia de 10Fr para la oclusión de la vena cava (4/40) y la vena porta (4/32) (Coda®, Cook® Birmingham, UK)
- Introdutores de 8Fr especialmente adaptados para incorporar un balón para la inyección de la solución génica. Estos se preparan con un introductor de 8Fr (Cook®) modificado adecuadamente para llevar un balón y su válvula de inflado correspondiente procedente de un catéter urinario Foley de 12Fr
- Sonda de ultrasonidos para el acceso portal percutáneo

5.1.2 Procedimiento endovascular

La anestesia se induce con ketamina (Imalgene® 100, Merial Francia; 5-10 mg/kg, im), midazolam (Hospira® 1 mg/ml, Madrid,

España; 0.3 mg/kg, im) y propofol (Lipuro® 2%, Braun, Melsungen, Alemania; 4-6 mg/kg, iv) y se mantiene con isoflurano (Isoflo®, laboratorios Abbott, Madrid, España; 2.5% a través de la vía inhalatoria). Se induce la relajación muscular con bromuro de vecuronio (Norcuron® 10 mg; 0.08 mg/kg, iv). Para la analgesia intraoperatoria, se administra morfina (0.4 mg/kg, iv). Para la analgesia postoperatoria, se utiliza buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough, Madrid, España; 0.02 mg/kg, iv).

El acceso vascular se consigue mediante agujas de punción de 18 G. Para el acceso venoso yugular y femoral se emplean guías hidrofílicas y de Teflón de 0.035 pulgadas e introductores de 18 Fr (Gore®). Para el acceso percutáneo a la vena porta se utilizan introductores de 5 y 11 Fr. Para conseguir la oclusión venosa, se emplean catéteres multipropósito de 5 Fr y balones de angioplastia de 10 Fr para venas cava (4/40) y porta (4/32) de Cook® (Birmingham, UK). Para la perfusión del gen, se utiliza el catéter con balón fabricado por nosotros, descrito en el apartado anterior, para poder inyectar el gen bajo las condiciones de flujo adecuadas sin retroceso de la solución. El acceso portal percutáneo se realiza con la ayuda de una sonda ecográfica.

En el modelo de cateterismo abierto (n=5, 4 para el gen hAAT y 1 para nanopartículas de oro), se utilizan las referencias anatómicas para acceder a la vena yugular empleando agujas de punción de 18 G. Siguiendo el método de Seldinger [72], y con el uso de una guía de Teflón, un introductor de 18 Fr y 25 cm de longitud se sitúa en la vena yugular interna. A través de este introductor, y usando un catéter multipropósito de angioplastia de 5 Fr, se accede a una

vena suprahepática medial. Entonces, se realiza el cambio del catéter por el introductor con balón de 8 Fr personalizado. La correcta posición del catéter y la adecuada oclusión venosa del balón, se confirma mediante inyección de solución de contraste y observación radioscópica. Después, la solución salina conteniendo el gen se perfunde a través de este introductor.

En el procedimiento cerrado (n=3), se accede a la vena cava inferior a través de una ruta dual: la vena yugular interna y la vena femoral. Para la primera ruta, el procedimiento empleado es similar al indicado para el procedimiento abierto pero el balón del introductor personalizado se sitúa en la cava, cerca de la entrada al hígado pero sin bloquear la vena suprahepática. Para la segunda ruta, se emplea la misma técnica Seldinger para implantar otro introductor de 18 Fr y 25 cm de longitud en la vena femoral externa. Un catéter de angioplastia de 10 Fr con un balón de 4 cm se sitúa en la vena cava infrahepática a través del introductor de 18 Fr de la femoral.

Con el emplazamiento de estos dos catéteres con balón, el acceso de la cava al hígado queda cerrado. Entonces, se accede a la rama derecha de la vena porta mediante una aguja de punción utilizando una guía de ecografía. Cuando se alcanza un retorno de sangre apropiado, una guía de Teflón se introduce en el sistema portal con un introductor de 5 Fr (Accustic®). Empleando una guía de intercambio, se implanta un introductor de 11 Fr en la vena porta. Este introductor permite situar un catéter de angioplastia de 10 Fr con un balón de 4 cm en la rama principal de la vena porta. Cuando los catéteres están situados adecuadamente, se hinchan

temporalmente los balones para confirmar (mediante la inyección distal a través de todos los catéteres de solución yodada de contraste) la creación de un compartimento estanco en el hígado. La tolerancia clínica de los animales se comprueba. Las funciones vitales del animal son monitorizadas continuamente durante toda la intervención. El hinchado de los balones aísla el hígado para la perfusión retrógrada de la solución génica a todo el órgano a través del introductor de 8 Fr de la vena yugular. Tras la inyección retrógrada de la solución de ADN, los balones se mantienen hinchados durante 5 minutos para facilitar la entrada del gen a los hepatocitos. Tras este periodo, se desinflan los balones para restablecer la vascularización del órgano. La hemostasia del tracto de la punción portal se consigue empleando Spongostan® (Nycomed pharma, Madrid, España) mezclado con solución yodada de contraste y una guía fluoroscópica. Finalmente, se quitan los introductores y catéteres de las venas yugular y femoral, asegurando la hemostasia por compresión manual. Los cerdos se sacrifican 14 días tras la operación empleando cloruro de potasio (Braun 2 mEq, 20 mEq, iv), después de ser sedados. Se toman muestras de sangre (2 ml) de una vena de la oreja antes de la inyección del plásmido (0 h) y los días 1, 2, 4, 7, 10 y 14 después de la inyección, antes del sacrificio. Tras el sacrificio, se extrae el hígado y se toman muestras tisulares representativas del órgano de cada lóbulo para posteriores análisis.

5.1.3 Transferencia génica a hígado de cerdo in vivo

Tanto en procedimiento abierto como cerrado, tras asegurarse del área de perfusión con solución de contraste, se perfunden 200 ml de una solución salina conteniendo el gen hAAT (20 µg/ml) a través del introductor de 8 Fr con balón, situado en la vena yugular, a 20 ml/s. Tras la intervención, el animal se recupera y se mantiene en estabulación durante un periodo de 14 días, durante los cuales se toman muestras sanguíneas periódicamente (día de la intervención o d0 y los días 1, 2, 4, 7 10 y 14 tras la intervención). El día 14 tras la intervención, los animales se sacrifican y se toman muestras tisulares representativas de todas las zonas del hígado de aproximadamente 1 mm de grosor bajo condiciones estériles y se estabilizan en solución RNAlater® (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las muestras se procesan un día después para el análisis molecular y evaluar así la eficacia de entrega, transcripción y traducción del gen transfectado.

5.2 Segmentos hepáticos humanos

5.2.1 Material empleado para la cateterización

- Introductor corto de 9 Fr (Cook®)
- Catéter corto de 9 Fr (Cook®)
- Jeringa de 50 ml

5.2.2 Segmentos hepáticos

Los segmentos hepáticos humanos se obtienen de resecciones quirúrgicas de pacientes portadores de tumor. Los segmentos se sellan del mismo modo que el fragmento de órgano que queda en

el paciente, de la misma manera que hacen los cirujanos en la práctica clínica diaria. El parénquima hepático se sella con sutura de seda de 3/0 o con grapas cuando el vaso es mayor de 2-3 mm y por electrocauterización cuando es más pequeño. Se utilizaron 19 segmentos para el estudio molecular con el gen marcador eGFP y 14 para el estudio con el gen hIL10. De 10 de los segmentos transfectados con el gen eGFP, se utilizaron 14 muestras para fluorescencia o inmunohistoquímica. Para el estudio ultraestructural, se emplean 6 segmentos hepáticos adicionales (n=3 sin nanopartículas de oro; n=3 con nanopartículas de oro). Se siguieron los protocolos de la Declaración de Helsinki y todos los pacientes dieron por escrito su consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico de Valencia.

5.2.3 Transferencia génica a segmento hepático humano ex vivo

Tras la extirpación, los segmentos hepáticos (418.0 ± 227.2 g) se trasladan inmediatamente al laboratorio en condiciones de esterilidad y todo el procedimiento de transferencia génica y recogida de muestras se realiza en menos de 90 minutos. Se sitúa un introductor flexible de 9 Fr lleno de solución salina en una vena hepática marcada por el cirujano. Después de la fijación del introductor, se inyecta solución yodada de contraste (máximo el 1 % del peso del segmento) a baja velocidad para confirmar la correcta posición del catéter, que no haya pérdida del volumen inyectado y determinar el área de perfusión.

Para el estudio de la transferencia génica, se inyecta la solución portadora del gen en un volumen equivalente a 1/5 ó 1/10 del peso del segmento. La concentración del plásmido es de 20 µg/ml y la inyección se realiza a 10 ó 20 ml/s. Además, se incluye otro grupo de inyección de solución génica (volumen 1/5) a baja velocidad (1 ml/s), como control. Después de la inyección, se dejan pasar al menos 5 minutos con el catéter en su posición para facilitar la entrada del plásmido a las células. Tras este periodo, se obtienen muestras de tejido de diferentes áreas del segmento de 1 mm de grosor, aproximadamente. Estas muestras se cultivan en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a 37° C en condiciones estériles, en una atmósfera con el 5 % de CO₂, para que las células que incorporaron el plásmido tengan el tiempo suficiente para poder decodificar el gen y expresar la proteína. Las muestras se sacan de cultivo a las 24 y 48 horas tras la transfección, para eGFP, y a las 24 y 72 horas para el gen hIL10, se procesan y se realizan ensayos moleculares e histológicos. Para el estudio ultraestructural, se realiza el mismo experimento pero inyectando nanopartículas de oro de 4 y 15 nm (10¹² nanopartículas/ml) en solución de glutaraldehído al 2,5% en PBS, para una posterior observación bajo el microscopio electrónico de transmisión.

6 Ratones

6.1 Material empleado para la inyección

- Jeringas de 3 ml libres de látex (Beckton Dickinson, Madrid, España)

- Agujas de 25G

6.2 Transferencia génica a hígado de ratón *in vivo*

Para la transferencia génica en el hígado se inoculan los ratones C57BL/6 por la vena de la cola usando jeringas sin látex de 3 ml (Beckton Dickinson, Madrid, España) y agujas de 25G con un volumen de suero salino equivalente al 10% de su peso (2mL) a una velocidad de 0.3 ml/s. Los volúmenes de suero salino contienen diferentes concentraciones de plásmido (5 µg/ml (n=5); 20 µg/ml (n=7); 80 µg/ml (n=6) y 320 µg/ml (n=4)).

El día 7 después de la inyección, se induce la anestesia y se recoge una muestra de sangre a través de la vena cava (1ml) en viales heparinizados. Con esta muestra se sigue el mismo procedimiento de centrifugado y conservación de las muestras mencionado anteriormente. A continuación, una vez sacrificado el animal por dislocación cervical, se toman muestras de tejido hepático. Una porción del tejido se conserva en formaldehído 4% para el análisis histológico, mientras que otra porción se estabiliza en RNAlater® solution (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Transcurridas 24h de incubación en RNAlater, se realiza el análisis molecular de DNA, RNA y proteína en el tejido hepático.

7 Análisis cuantitativo del ADN y ARN por PCR y RT-PCR

7.1 eGFP

Las muestras hepáticas de cerdos y segmentos hepáticos humanos se cortan y homogenizan en tampón de homogenización (Promega®, Barcelona, España) con un Ultra-Turrax (Hielscher

Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania). La extracción y purificación del ADN y el ARN del tejido se llevó a cabo mediante los kits específicos del sistema automatizado Maxwell (Promega®, Barcelona, España). Después de la purificación, ARN y ADN se cuantifican por espectrofotometría (Nanodrop®, Fischer Scientific, Madrid, España).

El ARN se retrotranscribe a ADNc con 1 µg de ARN total (libre de ADN), hexámeros aleatorios y *High Capacity cDNA Archive Kit* (Life technologies, Madrid, España). Para la PCR cuantitativa a tiempo real, se emplea *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life technologies, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el software *Primer Express* (Life technologies, Madrid, España). Los cebadores específicos para el gen eGFP son:

Fw: 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3', Tm: 53.9 °C

Rv: 5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGGG-3', Tm: 54.9 °C

Los datos cuantitativos se calculan como el número de copias de gen presente en la solución del ADN extraído y purificado y el número de copias de ARNm del gen eGFP en la de ARN purificado procedente del homogenizado tisular. El cálculo es posible al interpolar el dato de la PCR utilizando una curva estándar preparada con el mismo plásmido utilizado para la transfección. La curva se prepara realizando diluciones seriadas (1/10) del plásmido desde 1 a 1.000.000 de copias. La curva presenta un

relación lineal desde 100 a 1.000.000 copias y todas las muestras se encontraron en este rango. La cantidad total de ADN cargado es de 1 µg por muestra, mientras que la de ARN (ADNc) es de 100 ng. La sensibilidad teórica del procedimiento para la detección del gen eGFP en el ADN es superior a 10^{-3} copias por célula. Para el ARN es de 0.02 copias por célula.

7.2 hAAT

A partir de las muestras hepáticas de cerdos, ratones (gold standard) y segmentos hepáticos humanos (control), se obtienen ADN y ADNc del mismo modo que se ha explicado en el apartado anterior. Para la PCR cuantitativa a tiempo real, se emplea *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life technologies, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos específicos para hAAT se diseñaron mediante el software *Primer Express* (Life technologies, Madrid, España):

Fw: 5'-GAAGACAGATACATCCCACCATGA-3', Tm: 53.9 °C

Rv: 5'-GGTATAGGCTGAAGGCGAACTC-3', Tm: 54.4 °C

Los datos obtenidos de la PCR se valoran sobre una curva estándar especialmente preparada para este propósito. Esta curva estándar se prepara con ADN humano cuantificado, diluido de manera seriada 1/10. El rango lineal de la curva va desde 10 a 10,000,000 copias del gen o ARN, con un coeficiente de correlación > 0.97. En nuestra PCR cuantitativa, se carga 1 µg de ADN total de cada muestra (correspondiente a la cantidad de ADN de 185,000 células) y 100 ng de ADNc total (correspondiente a la cantidad de ARN de 5,000 células), aproximadamente. De este

modo, la sensibilidad de la curva nos permite cuantificar hasta 5×10^{-5} copias de ADN hAAT por célula y 2×10^{-3} copias de ARN hAAT por célula.

7.3 hIL10

Las muestras hepáticas de segmentos hepáticos humanos se procesan del mismo modo que en los apartados anteriores para obtener el ADN y el ADNc.

Para la PCR cuantitativa a tiempo real, se emplea TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life technologies, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como oligonucleótidos se emplea una premezcla comercial que incluye los cebadores y la sonda TaqMan específica para el gen (codificante) de la interleuquina-10 humana (referencia Hs00961622_m1; Life technologies, Madrid, España). Las condiciones de la PCR son las estándar (60° C Tm).

Los datos obtenidos de la PCR se valoran sobre una curva estándar especialmente preparada para este propósito. Esta curva estándar se prepara con el plásmido hIL10 cuantificado, diluido de manera seriada 1/10. El rango lineal de la curva va desde 1,000 a 1,000,000 copias del gen o ARN, con un coeficiente de correlación > 0.99 . En nuestra PCR cuantitativa, se carga 1 μ g de ADN total (correspondiente a la cantidad de ADN de 185,000 células) y 100 ng de ADNc total (correspondiente a la cantidad de ARN de 5,000 células), aproximadamente. De este modo, la sensibilidad de la curva nos permite cuantificar hasta 5×10^{-3} copias de ADN hIL10 por célula y 2×10^{-1} copias de ARN hIL10 por célula.

8 Determinación de proteína

8.1 eGFP

8.1.1 Microscopía de fluorescencia

Para el estudio de fluorescencia, se utilizan criosecciones de segmentos hepáticos humanos (n=7) cultivados durante 24 horas tras la inyección del gen eGFP. Las criosecciones se examinan y fotografian con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss, Madrid, España).

8.1.2 Inmunohistoquímica

Para el estudio inmunohistoquímico, se fijan en paraformaldehído al 4 % las muestras de segmentos hepáticos humanos (n=7) cultivados durante 24 horas tras la inyección del gen eGFP y se embeben en parafina. Las secciones tisulares se desparafinan y se incuban en albúmina sérica bovina al 4 % en salino tamponado con fosfato (1 hora a 37° C). A continuación, se incuban las secciones en solución con el anticuerpo (anti-eGFP de conejo diluido 1:300) a 37° C durante una hora más. Se incluyen, como controles, muestras incubadas en ausencia del anticuerpo específico. La detección se lleva a cabo con el kit de peroxidasa LSAB-2 de DAKO (Barcelona, España). Antes de la deshidratación, el tejido se contrasta con hematoxilina.

8.1.3 ELISA

Las muestras de tejido hepático (8 por hígado, correspondientes a distintas áreas del órgano) son homogenizadas con un Ultra-Turrax y se purifica la proteína por centrifugación secuencial

empleando acetona al 80 % fría y etanol al 70 %. El extracto proteico se resuspende en buffer RIPA con inhibidores de proteasa (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NaF 10 mM, Nonidet P-40 al 0.5%, sodio ortovanadato 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, PMSF 100 µM).

Se cuantifica el contenido de proteína total en cada muestra mediante el kit de cuantificación de proteína *NanoOrange protein quantitation kit* (Life technologies, Madrid, España). Se determina la proteína eGFP presente en cada muestra mediante western blot (WB), que se realiza como anteriormente descrito [74]. El anticuerpo de detección se obtuvo de Abcam (Ab290, Cambridge, MA, USA). El anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa se obtuvo de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La cuantificación de la proteína eGFP en las muestras se lleva a cabo mediante un kit de ELISA de alta sensibilidad ya que el WB mostró muy baja cantidad de la proteína. El kit de ELISA se obtuvo de Cell Biolabs (akr-121, San Diego, CA, USA) y se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto los anticuerpos como la proteína eGFP recombinante para la preparación de la curva están incluidos.

Brevemente, se incuban las muestras en la placa pre-cargada con anticuerpo de detección anti-GFP y después se añade el anticuerpo secundario biotinilado en una dilución 1:1000 para una segunda incubación. Tras los lavados correspondientes, se añade una solución de estreptavidina (1:2000) conjugada con la enzima encargada de la reacción colorimétrica. Tras la incubación y los

lavados, se añade la solución con el sustrato y se lee la absorbancia de las muestras en la placa a 450 nm.

La curva estándar es lineal desde 0 hasta 250 pg/ml de la proteína eGFP, con un coeficiente de correlación superior a 0.99. Los resultados de las muestras estuvieron dentro de ese rango en todos los casos. Los resultados, obtenidos como concentración (pg/ml), se transforman a número de moléculas por célula considerando el peso molecular de la proteína (27 kDa, [75]) y la cantidad de proteína total presente por célula normalizada en cada muestra individual.

8.2 hAAT

Las muestras tisulares del hígado de cerdos, ratones y humanos se homogenizan mediante un homogenizador Ultra-Turrax y las impurezas se descartan por precipitación con centrifuga. El contenido total de proteína en la muestra se determina mediante el *NanoOrange protein quantitation kit* (Life technologies, Madrid, España).

8.2.1 *Western blot*

El western blot se lleva a cabo como ya se describió anteriormente (Masiá et al. [74]). Brevemente, se utilizan anticuerpo anti-hAAT de cabra (1/2500) como anticuerpo de captura, combinado con un anticuerpo de detección de conejo conjugado con peroxidasa (1/1000).

8.2.2 ELISA

El ensayo ELISA para la determinación de la proteína hAAT tanto en muestras tisulares como sanguíneas se lleva a cabo en placas de valoración de 96 pocillos (CoStar), como ya ha sido descrito anteriormente [27, 76]. Brevemente, se utilizan anticuerpo anti-hAAT de cabra (0.2 mg/pocillo) como anticuerpo de captura y anticuerpo anti-hAAT de cabra conjugado con peroxidasa (1.5 mg/pocillo) como anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección (2 mg/ml) se diluye en tampón de adsorción (carbonato 0.05 M; pH 9.6), se distribuye en la microplaca (100 ml/pocillo) y se incuba a 4 °C durante toda la noche. Tras tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05 % (200 ml/pocillo), la placa se incuba durante otras dos horas a 37 °C con albúmina sérica bovina al 1 % (PBS-albúmina; 200 ml/pocillo) para bloquear los sitios de unión no-específica. Tras el lavado cinco veces de la placa con PBS-Tween, se añaden en el pocillo correspondiente 100 ml de proteína hAAT pura (de 0 a 30 ng/ml) para la curva o muestras de tejido homogenizado o plasma problema. Tras otra incubación de la placa a 37° C durante dos horas, los pocillos se lavan de nuevo cinco veces con el PBS-Tween y se añade el anticuerpo de detección conjugado con la peroxidasa (15 mg/ml; 100 ml/pocillo) en PBS-albúmina. Se vuelve a incubar la placa durante otras dos horas a 37° C. Transcurrido este tiempo, se induce la reacción enzimática de la peroxidasa con o-fenilendiamina (0.4 ng/ml, en buffer citrato-fosfato; pH 5) con H₂O₂ al 30 % (1.5 ml/ml). La reacción se detiene dos minutos y medio después añadiendo H₂SO₄ 2M. Los anticuerpos frente a hAAT se obtuvieron de Sigma-

Aldrich (Madrid, España). El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano se obtuvo de ICN (Aurora, OH, USA).

La curva estándar es lineal desde 1.25 hasta 80 ng/ml de la proteína hAAT, con un coeficiente de correlación superior a 0.99. Los resultados de las muestras estuvieron dentro de ese rango en todos los casos. Los resultados, obtenidos como concentración (pg/ml), se transforman a número de moléculas por célula considerando el peso molecular de la proteína (50 kDa, [77]) y la cantidad de proteína total presente por célula normalizada en cada muestra individual.

8.2.3 *Inmunohistoquímica*

Para el estudio inmunohistoquímico, se fijan las muestras de tejido hepático en paraformaldehído al 4 % y se embeben en parafina. Una vez desparafinadas las secciones tisulares, se incuban con albúmina sérica bovina al 4 % en solución salina tamponada con fosfato durante una hora a 37° C. Entonces, las secciones se incuban en solución de anticuerpo (diluida 1:300 en anti-hAAT de conejo) durante una hora a 37° C. La detección se realiza empleando el kit de peroxidasa LSAB-2 de DAKO (Barcelona, España). El tejido se contrasta con hematoxilina antes de la deshidratación.

8.3 hIL10

8.3.1 *ELISA*

El ELISA para la detección de la proteína interleukina-10 humana se realiza mediante el kit comercial específico para esta proteína BD OptEIA® Human IL-10 ELISA Set (Beckton and Dickinson Biosciences, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añade el anticuerpo de captura a los pocillos de la placa y, tras incubación de 24 horas y los lavados, se bloquea la placa. A continuación, tras los lavados pertinentes, se añade la solución problema y la curva estándar y se incuba. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizan los lavados y se añade la solución de trabajo, que incluye el anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa. Tras la incubación con el 2º anticuerpo, se lava y se le añade la solución de detección, que se deja actuar durante 30 minutos en oscuridad. A continuación, se detiene la reacción y se lee la placa a 450 nm. La curva estándar fue lineal desde 0 hasta 500 pg/ml de la proteína hIL10, con un coeficiente de correlación superior a 0.99. Los resultados de las muestras estuvieron dentro de ese rango en todos los casos. Los resultados, obtenidos como concentración (pg/ml), se transforman a número de moléculas por célula considerando el peso molecular de la proteína (20 kDa, [78]) y la cantidad de proteína total por célula normalizada presente en cada muestra individual.

9 Expresión de los resultados moleculares

La representación gráfica de los datos y el análisis estadístico se lleva a cabo con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Los datos se expresan como el número de copias del gen, el ARN y la proteína por célula normalizada. Para calcular los parámetros relacionados con la entrega del gen y su proceso de decodificación genética, se tiene en consideración la siguiente información: a) para la entrega del gen por célula, consideramos el peso del genoma diploide de la especie transfectada (5.6 pg para el ratón, 5.4 pg para el cerdo y 6.6 pg para el humano; [79]); b) para evaluar la transcripción, consideramos 20 pg la cantidad total promedio de ARN en un hepatocito de mamífero [80-82]; c) para la traducción de la proteína por célula, consideramos 500 pg la cantidad total promedio de proteína presente en una célula mamífera [80-82]. De acuerdo con estas consideraciones, se evalúan los siguientes parámetros:

9.1 Índices

Los índices indican el número de copias de ADN, ARN y proteína por célula normalizada. Estos parámetros se determinan por cuantificación directa y se transformaron a copias por célula de acuerdo con los criterios mencionados anteriormente. Estos índices tienen un valor cuantitativo pero no muestran la calidad del procedimiento.

Cálculo de los índices por célula:

- **Índice de entrega génica (transfección) en cerdo: (nº copias ADN gen transferido /pg de ADN total) * 5.4**

- **Índice de entrega génica (transfección) en ratón: (nº copias ADN gen transferido /pg de ADN total) * 5.8**

- **Índice de entrega génica (transfección) en humano: (nº copias ADN gen transferido /pg de ADN total) * 6.6**

- **Índice de transcripción del gen en mamíferos: (nº copias de ARNm gen transferido /pg de ARN total) * 20**

- **Índice de traducción del gen en mamíferos: (nº moléculas de proteína codificada por el gen transferido /pg de proteína total) * 500**

9.2 Actividad intrínseca de transcripción

La actividad intrínseca es un parámetro que establece relaciones entre los diferentes índices para así poder evaluar la disponibilidad molecular aparente del ADN entregado. Se refieren principalmente a la calidad aparente del procedimiento. En cada caso, la actividad intrínseca de transcripción se describe como: ARNm/ADN (copias/célula).

El cálculo de la actividad intrínseca se realiza del siguiente modo:

- **Actividad intrínseca de transcripción del gen en hígado de cerdo: [(nº copias de ARNm gen transferido/pg de ARN total) * 20]/[(nº copias de ADN gen transferido /pg de ADN total) * 5.4],**

- **Actividad intrínseca de transcripción del gen en hígado de ratón:** $[(n^{\circ} \text{ copias de ARNm gen transferido/pg de ARN total}) * 20] / [(n^{\circ} \text{ copias de ADN gen transferido /pg de ADN total}) * 5.8]$,
- **Actividad intrínseca de transcripción del gen en hígado humano:** $[(n^{\circ} \text{ copias de ARNm gen transferido /pg de ARN total}) * 20] / [(n^{\circ} \text{ copias de ADN gen transferido /pg de ADN total}) * 6.6]$;

Aunque se han llevado a cabo algunos estudios previos para calcular estos parámetros, los valores exactos de las actividades intrínsecas para genes de referencia habituales no están disponibles en las bases de datos. Sin embargo, se pueden calcular algunos de ellos puesto que se han establecido algunos de ellos como bajos, medios o altos productores de ARN (5-15, 200-400 y $> 10^4$ copias de ARN por célula, respectivamente) y proteína (10^2 - 10^3 , 10^3 - 10^5 y $>10^5$ copias de proteína por célula, respectivamente, en base al tipo celular y el gen concreto [80]).

10 Análisis estadístico de los datos

Los datos se representaron gráficamente y se analizaron estadísticamente con el software GraphPad Prism 5 y el programa informático R. Se utiliza Two-way ANOVA para comparar los efectos de la velocidad de flujo y el sentido de la inyección en la eficiencia de entrega, transcripción y traducción entre los diferentes grupos. Aunque las muestras biológicas no siempre presentan una distribución Gaussiana, empleamos este test

paramétrico porque comparamos un gran número (24) de muestras por grupo. En estos casos la distribución se asemeja a la Gaussiana y el test ANOVA se utiliza rutinariamente. Por el contrario, cuando comparamos los promedios de los distintos grupos (velocidad de flujo y sentido de la inyección) independientemente, utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney, que es el más adecuado para un número bajo de muestras biológicas con una distribución no Gaussiana. Para la comparación global de los índices de entrega, transcripción, traducción y secreción de la proteína de los diferentes modelos animales y los diferentes procedimientos aplicados en cerdo, utilizamos un modelo mixto de análisis de varianza, que tiene en consideración las medidas repetidas (varias muestras en un mismo animal, por ejemplo).

11 Determinación de transaminasas en cerdos

Se toman muestras de sangre periférica a distintos tiempos: 0 horas (antes de la inyección), 1 hora tras la inyección y 24 horas después, antes del sacrificio para los ensayos a corto plazo de eGFP y también los días 2 y 5 en ensayos a medio plazo de 14 días. Con estas muestras, además de la traducción del gen de inteés, determinamos las principales enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)) por reacciones enzimáticas y espectrofotometría y permite evaluar así el posible daño hepático inducido por el procedimiento.

12 Síntesis de las nanopartículas de oro

Todos los reactivos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron tal y como fueron recibidos, sin purificación adicional. Las nanopartículas de oro se sintetizan siguiendo una modificación del método Turkevich [83]. Brevemente, se disuelven 0.4 gramos de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 90 ml de agua en un frasco redondo de dos cuellos (1.3 mM HAuCl_4). La solución resultante se calienta a ebullición y se somete a reflujo. En ese momento, se precalientan 9 ml de una solución de citrato de sodio 47.2 mM (0.125 gramos de citrato de sodio en 9 ml de agua) y se añaden rápidamente a la solución anterior. La solución pasó del amarillo al negro, y de éste al rojo oscuro. Tras el cambio de color, la solución se deja atemperar hasta temperatura ambiente. La solución resultante se diluye con agua hasta un volumen final de 500 ml. Las nanopartículas de oro se caracterizan mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el microscopio Jeol 1010 (Tokyo, Japón). El diámetro promedio y la distribución del tamaño de las nanopartículas se determina mediante imágenes de TEM contando al menos 300 partículas y empleando el software Image Pro Plus de Media Cybernetics (Bethesda, MD, USA).

13 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se inyectan 200 ml de una solución de citrato conteniendo 10^{12} partículas/ml de oro, de 4 y 15 nm de diámetro, a hígado de cerdo, siguiendo los procedimientos de cateterismo abierto y cirugía, para estudiar la distribución de las mismas dependiendo de su diámetro. Se toman pequeñas muestras de tejido de diferentes áreas del

hígado y se embeben en una solución Sørensen tamponada con fosfato (pH 7.4) conteniendo glutaraldehído al 2.5 %. Varias muestras del hígados, de 2-3 mm³ de volumen, fueron procesadas del modo habitual e incluidas en resina Epoxy. Secciones ultrafinas de las muestras se tiñen con acetato de uranilo y se observan bajo el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010. Estas secciones no se tiñen con citrato de plomo, como habitualmente se hace, para facilitar la visualización de las nanopartículas de oro sin interferencias.

RESULTADOS

Hidrofección hepática no viral

1. Transferencia génica a hígado de cerdo vascularmente estanco mediante cirugía *in vivo* empleando el gen marcador eGFP

1.1 Procedimiento de transferencia

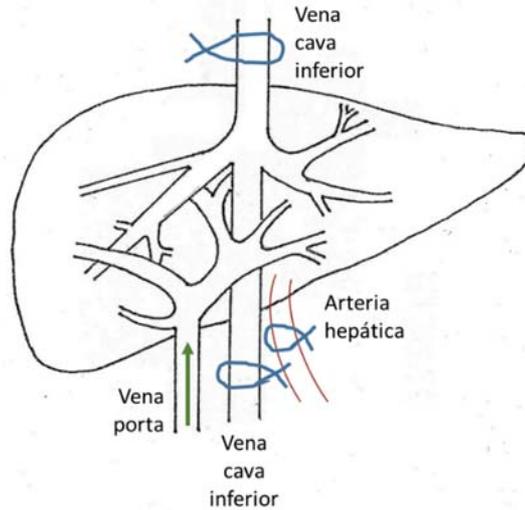
La reproducción exitosa del procedimiento de transferencia génica hidrodinámica en animales con mayor similitud anatómica con el humano, como el cerdo, serviría de base para la traslación de la técnica a la clínica [84]. Los efectos hemodinámicos aconsejaban diseñar procedimientos de hidrofección que permitieran mimetizar el proceso ocurrido en ratón pero con mínima repercusión a nivel sistémico.

En el modelo murino, la eficacia del procedimiento se verifica porque la solución génica inyectada a través de la vena de la cola llega al lecho capilar venoso del hígado hasta alcanzar los hepatocitos. Este volumen es capaz de invertir el sentido de circulación normal de la sangre. Transcurridos unos segundos, la sangre procedente del corazón es capaz de vencer esa resistencia y, de manera pulsátil, empuja la solución inyectada restableciendo la circulación venosa de retorno. Con el propósito de imitar estas condiciones, se desarrolla junto con los cirujanos hepáticos un procedimiento reversible que permita aislar por completo el hígado de la circulación *in vivo* en cerdo. El procedimiento de cierre vascular hepático se describe en material y métodos. Una vez confirmado el cierre completo del hígado, se perfunde la solución génica.

Esta estrategia permite emplear diferentes vías de perfusión venosa al hígado: a) anterógrada; b) retrógrada. La imagen

superior muestra esquemáticamente el procedimiento de transferencia génica venosa anterógrada, realizando la perfusión a través de la vena porta con el resto de vasos cerrados. En la imagen inferior se observa el esquema del hígado cuando la transferencia se realiza a través de la vena cava infrahepática (venosa retrógrada). Tras realizar la inyección de la solución génica y el periodo de incubación del gen, se restablece la circulación en el hígado siguiendo una secuencia de abertura de los vasos contraria a la empleada para el cierre.

Modelo de Perfusión Anterógrada



Modelo de Perfusión Retrógrada

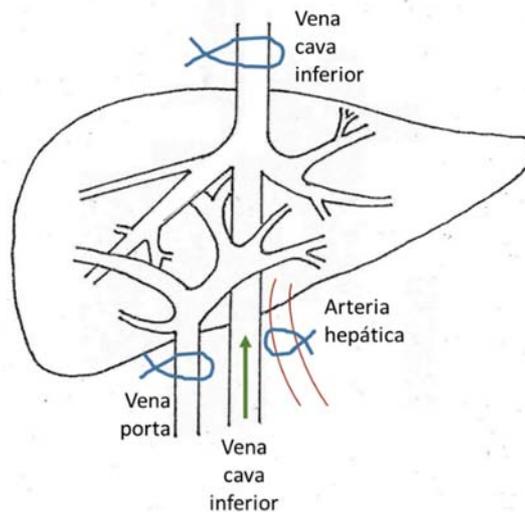


Figura 5. Figura esquemática de la transferencia génica hepática empleando el modelo cerrado mediante cirugía. En la imagen superior (modelo de perfusión anterógrada) se muestra esquemáticamente el cierre vascular completo del hígado a excepción de la vena porta, por la cual se realiza la perfusión de la solución génica. En la imagen inferior (modelo de perfusión retrógrada) se muestra el cierre vascular total hepático excepto la vena cava infrahepática, por la cual se inyectará el gen.

Llevar a cabo una transferencia génica dirigida sobre un órgano permite utilizar volúmenes más reducidos que el animal sea capaz de tolerar sin efectos adversos. Distintos estudios realizados con anterioridad apuntaban la necesidad de utilizar condiciones exigentes por lo que para seleccionar las condiciones adecuadas de perfusión se realizan unos experimentos exploratorios preliminares utilizando diferentes volúmenes (200, 400 y 600 ml) y velocidades de flujo (10, 20, 40 y 60 ml/s). En nuestras manos, las condiciones más suaves median una mayor eficiencia. Decidimos iniciar los experimentos utilizando un volumen de aproximadamente 1/3 el peso del hígado de un cerdo basado en el peso del órgano en un cerdo de 20 kg, que es aproximadamente de 500-600 gr.

1.2 Confirmación de la seguridad del procedimiento de cierre vascular completo del hígado *in vivo* mediante la monitorización de las constantes vitales del animal

Algunos estudios previos indicaban que era posible aislar vascularmente el hígado en cerdos durante periodos de hasta 20 minutos sin causar daños en el organismo del animal [70, 71]. En nuestros experimentos el tiempo total de exclusión vascular completa promedio es inferior a los 9 minutos. A pesar de eso, los animales son permanentemente monitorizados durante la intervención para comprobar las constantes vitales y evaluar las posibles diferencias en base al sentido de la inyección. En la tabla 2 se muestran los datos hemodinámicos de los animales durante

la intervención. Están representadas las presiones sistólica y diastólica, la presión parcial de oxígeno, la frecuencia cardiaca en las distintas fases del procedimiento y los cambios en el electrocardiograma. Como se puede observar, no existen diferencias de comportamiento entre las inyecciones anterógrada y retrógrada indicando que los cambios hemodinámicos se deben únicamente a la exclusión vascular. La presión arterial basal sistólica/diastólica de los animales fue de 87/61 mmHg para el grupo de cerdos inyectados por vía retrógrada y de 98/66 mmHg para el grupo de la inyección anterógrada. La exclusión vascular conduce en ambos grupo a una bajada marcada de la presión arterial, alrededor del 40 % (50/40 mmHg para el grupo de inyección retrógrada y 45/35 mmHg para el grupo de inyección anterógrada), que revierte parcialmente con la inyección de la solución génica. La presión arterial del animal sigue descendiendo mientras la circulación está cerrada, hasta alcanzar unos niveles de aproximadamente 40/30 mmHg para ambos grupos. La revascularización media una recuperación casi instantánea de la presión arterial de tal manera que en menos de un minuto ya no existe diferencia con respecto a los valores basales (76/54 mmHg en el grupo de la perfusión retrógrada y 82/53 mmHg en el grupo de perfusión anterógrada). No se revela ningún cambio ni en la presión parcial de oxígeno, que se mantiene por encima del 98 % durante toda la intervención, ni tampoco cambios morfológicos en el electrocardiograma.

PARÁMETROS HEMODINÁMICOS

Etapa de la intervención	Inyección en vena Cava (n=6)		Inyección en vena Porta (n=6)		Global (n=12)		
	Presión Sistólica (mmHg)	Presión Diastólica (mmHg)	Presión Sistólica (mmHg)	Presión Diastólica (mmHg)	Frec. Cardíaca (bpm)	SO2 (%)	ECG
Basal	87.3 ± 9.2	60.8 ± 6.4	98.3 ± 7.9	65.5 ± 13.4	50-60	>98	Sin cambio
Exclusión Vascular							
Pre-inyección	49.5 ± 3.8 ***	39.5 ± 4.8 **	44.3 ± 13.8 ***	34.5 ± 7.1 ***	80-90		
Fin de la Inyección	62.5 ± 3.1 **	46.3 ± 3.0	54.0 ± 5.7 ***	39.0 ± 1.4 *	75-80	>98	Sin cambio
Pre-reperfundición	42.0 ± 5.6 ***	33.3 ± 3.8 **	39.3 ± 5.1 ***	29.3 ± 5.1 ***	80-95		
Reperfundición							
1 min	75.5 ± 21.9 ††	53.5 ± 20.5	82.0 ± 0.0 ††	53.0 ± 0.0	70-80		
2 min	81.7 ± 14.6 †††	57.0 ± 11.8 †	90.0 ± 0.0 †††	57.0 ± 0.0	70-80	>98	Sin cambio
3 min	80.7 ± 32.3 †††	67.0 ± 36.4 ††	84.3 ± 6.7 †††	53.3 ± 2.5 †	65-75		
5 min	83.0 ± 4.2 †††	51.0 ± 1.4	86.8 ± 8.1 †††	58.0 ± 6.3 ††	60-70		
10 min	95.5 ± 4.9 †††	59.5 ± 2.1	93.0 ± 6.2 †††	59.0 ± 2.7 ††	55-65		

*=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001 vs basal

†=p<0.05; ††=p<0.01; †††=p<0.001 vs pre-reperfundición

Tabla 2. Parámetros hemodinámicos del cerdo durante el procedimiento de transferencia génica mediada por cierre vascular quirúrgico. En la tabla se presentan diferentes parámetros hemodinámicos de los animales durante la intervención como la presión arterial sistólica y diastólica (separados según el modelo de transferencia, anterógrado o retrógrado), la frecuencia cardíaca, la presión parcial de oxígeno (SO₂) y la presencia de cambios en el patrón electrocardiográfico. Se expresan como promedio \pm desviación estándar. Estas medidas se tomaron a diferentes tiempos: basal (antes de la intervención), pre-inyección (tras la exclusión vascular antes de la inyección del gen), fin de la inyección (justo al acabar de inyectar el gen), pre-reperusión (justo antes de la revascularización del hígado) y reperusión (tras abrir todas las ligaduras y permitir la circulación normal del órgano). Se encontraron las siguientes diferencias significativas cuando se realiza el test estadístico t-test: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$ vs basal y †= $p < 0.05$; ††= $p < 0.01$; †††= $p < 0.001$ vs pre-reperusión.

1.3 Confirmación de la seguridad del procedimiento de hidrofección mediante la determinación de transaminasas hepáticas

Para determinar si el proceso de hidrofección causa algún daño en la función hepática se toman muestras de sangre periférica antes de la inyección, una hora después y a las 24 horas y se determinan las concentraciones de la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) en unidades internacionales (U/I). Los resultados (tabla 3) muestran que el procedimiento causa un aumento en los niveles de AST (125 % en la inyección anterógrada, alcanzando 91.7 ± 16.6 U/I; 80 % en la perfusión por vena cava, hasta 72.4 ± 29.9 U/I) una hora tras la intervención, pero éste se ve parcialmente revertido (10 %) con la inyección portal y completamente recuperado con la inyección por vena cava 24 horas después de la intervención (82.3 ± 60.7 U/I y 32.4 ± 11.5 U/I, respectivamente), aunque no hay diferencia significativa entre los dos sentidos de inyección. Los niveles plasmáticos de ALT se

mantienen inalterados durante las 24 horas posteriores a la hidrofección. El nivel máximo alcanzado no supera las 150 U/I, por lo que no es clínicamente relevante.

Enzima	Tiempo Muestreo (h)	Vaso de inyección		Valores Normales
		Porta	Cava	
GOT/AST (UI)	0	40.7 ± 13.2	39.2 ± 10.6	15-55 UI
	1	91.7 ± 16.6	72.4 ± 29.9	
	24	82.3 ± 60.7	37.4 ± 11.5	
GPT/ALT (UI)	0	29.7 ± 4.0	30.4 ± 4.5	21-46 UI
	1	35.3 ± 2.3	32.8 ± 3.4	
	24	41.0 ± 14.0	36.8 ± 7.8	

Tabla 3. Daño hepático. En la tabla se muestran los niveles medios de las principales enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa), con su desviación estándar, a diferentes tiempos (0 horas=basal; 1 y 24 horas tras la intervención. Se comparan los niveles alcanzados en los dos modelos de perfusión, anterógrado (porta) y retrógrado (cava).

1.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de perfusión (flujo y sentido de inyección) para la transfección del gen marcador eGFP

En el momento de empezar los experimentos no existen unos parámetros cuantitativos que permitan evaluar objetivamente la eficiencia del procedimiento. Los estudios se centran en evaluar la entrada del gen transferido y la posterior expresión plasmática de la proteína codificada por dicho gen.

En experimentos utilizando el gen eGFP con diferentes condiciones de perfusión, se establecen los siguientes parámetros:

Índice de entrega aparente del gen

Índice de transcripción del gen

Índice de traducción de la proteína

Actividad intrínseca de transcripción

Otros experimentos exploratorios se llevan a cabo bajo condiciones más extremas, inyectando simultáneamente por las venas cava y porta a través de una conexión Y: a) 400 ml a 40 ml/s y b) 600 ml a 60 ml/s. El uso de estas condiciones exploratorias no mejoran los resultados alcanzados con condiciones más suaves. Los índices de entrega y transcripción del gen empleando estas condiciones exploratorias transcurridas 24 horas desde la transfección se muestran en el gráfico siguiente:

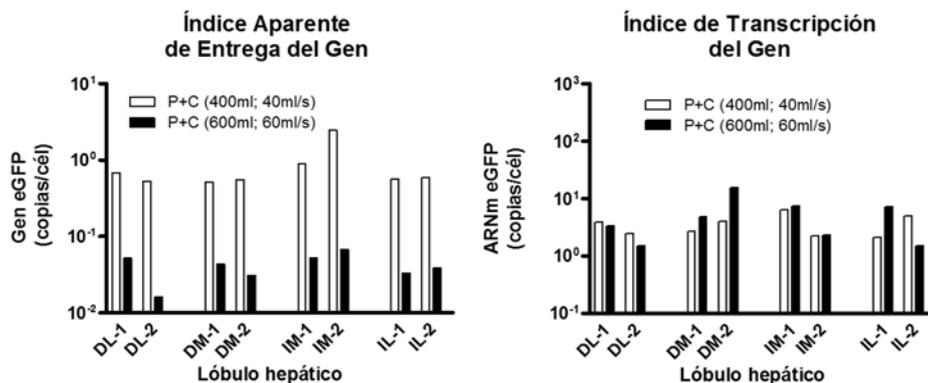


Figura 6. Índices moleculares de entrega y transcripción bajo condiciones exploratorias de transferencia. Se muestran los índices de entrega (en copias del gen por célula normalizada) y de transcripción (en del ARNm de eGFP por célula normalizada) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean condiciones exploratorias: 400 ml de solución génica a 40 ml/s y 600 ml de solución génica a 60 ml/s por vía anterógrada y retrógrada simultáneamente en ambos casos. Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior.

Los resultados mostrados a continuación corresponden a cerdos inyectados con 200 ml de solución salina conteniendo el gen eGFP en una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 10 y 20 ml/s por vía anterógrada y retrógrada. Transcurridas 24 horas desde la intervención, los cerdos se sacrifican y se toman muestras de tejido hepático correspondientes a las zonas superior e inferior de los 4 lóbulos principales. Se extrae el ADN, ARN y proteína y se cuantifica el número de copias mediante PCR cuantitativa en tiempo real y ELISA, respectivamente. La expresión de los datos como número de copias por célula se ha realizado en base al concepto de célula normalizada. Según las bases de datos, un

hepatocito de cerdo contiene 5.4 pg de ADN total, 20 pg de ARN total y aproximadamente 500 pg de proteína total.

1.4.1 Entrega aparente del gen

En la figura 7 se muestra el índice de entrega aparente del gen en las distintas muestras tomadas del hígado. Se habla de entrega aparente porque no se puede saber con total seguridad si todas las copias del gen han alcanzado el interior celular, ni si lo han hecho con la suficiente disponibilidad para ser transcritas. Se compara la entrega alcanzada dependiendo de la velocidad de perfusión y el sentido de la inyección. En la figura de la izquierda se muestra la entrega cuando la transferencia se realizó a 10 ml/s y en la figura derecha cuando se hizo a 20 ml/s. Los índices de entrega se expresan como número de copias de ADN del gen eGFP por célula. Se puede observar cómo la entrega resulta más eficiente cuando la inyección se lleva a cabo a menor velocidad, siendo significativamente superior ($p < 0.05$) en IM-1 por vía retrógrada cuando se compara consigo misma a 20 ml/s. No se observan grandes diferencias entre la vía anterógrada y retrógrada a 10 ml/s y además la entrega resulta muy homogénea a lo largo de todo el órgano. A 20 ml/s el índice de entrega aparente del gen resulta superior en todos los lóbulos cuando se inyecta por vía anterógrada a excepción del DL-2. La tasa de entrega del gen está entre 1 copia cada 10 células y 1 copia por célula.

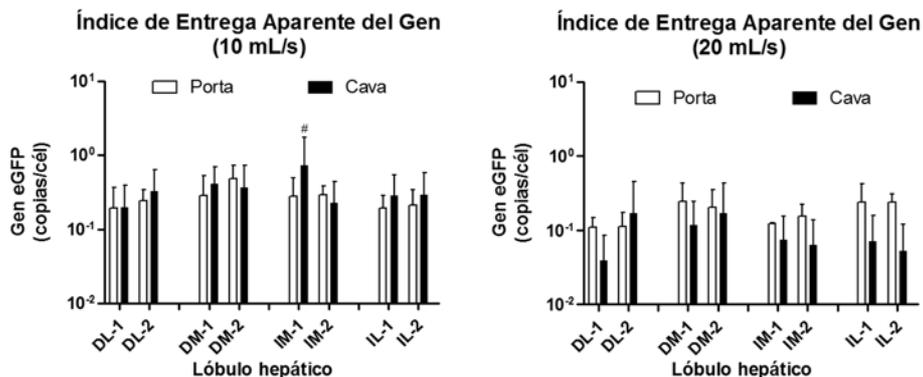


Figura 7. Índice de entrega aparente del gen. Se muestran las medias de los índices de entrega aparente del gen (en copias del gen por célula normalizada promedio, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 10 ml/s (izquierda) y 20 ml/s (derecha) por vena porta (vía anterógrada) o por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. Se encontró diferencia significativa (#: $p < 0.05$) en IM-1 al comparar las dos velocidades de perfusión tras aplicar el test estadístico Two-way ANOVA y el post-test de Bonferroni.

1.4.2 Transcripción del gen en tejido hepático

De estas mismas muestras se extrae el ARN, se cuantifica y se retrotranscribe a ADNc. El número de copias se cuantifica mediante PCR cuantitativa en tiempo real sobre una curva preparada para este propósito con el mismo plásmido transferido. En la figura 8 se muestra el índice de transcripción de cada zona del hígado tras la perfusión de eGFP a 10 ml/s (izquierda) y 20 ml/s (derecha). Los índices de transcripción se expresan como número de copias de ARN del gen eGFP por célula normalizada. Para cada velocidad se compara la tasa de transcripción mediada por vía anterógrada versus retrógrada. A 10 ml/s el índice de transcripción

del gen resulta superior por vía retrógrada a excepción de la muestra IM-2, aunque no aparece ninguna diferencia significativa. A 20 ml/s esta diferencia aumenta hasta alcanzar en IM-2 un índice de transcripción casi 100 veces superior ($p < 0.001$) a su homólogo transferido por vía anterógrada. El índice de transcripción en la muestra IM-2 con perfusión retrógrada a 20 ml/s resulta significativamente superior ($p < 0.001$) a cuando se perfunde a 10 ml/s. Del mismo modo que ocurre con el índice de entrega génica, la transcripción también resulta homogénea a lo largo del hígado para cada condición.

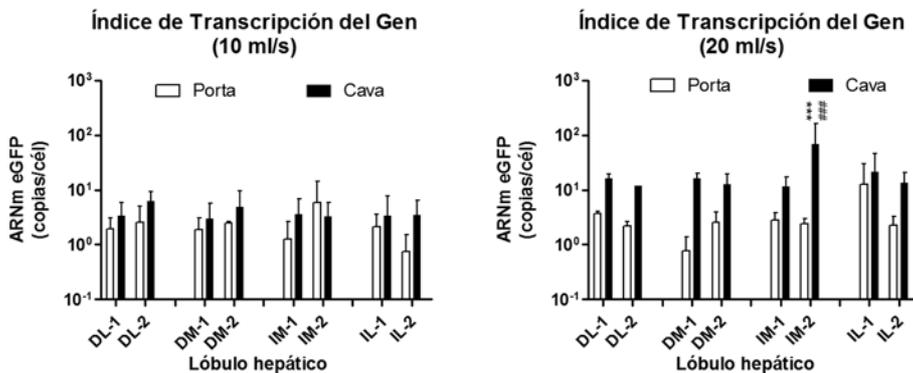


Figura 8. Índice de transcripción del gen. Se muestran las medias de los índices de transcripción del gen (en promedio de copias de ARNm del gen por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 10 ml/s (izquierda) y 20 ml/s (derecha) por vena porta (vía anterógrada) o por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. ***: $p < 0.001$ cuando se compara el sentido de la perfusión con la misma velocidad; ####: $p < 0.001$ cuando se compara la velocidad de perfusión utilizando el mismo sentido de inyección. Se utilizó el test estadístico Two-way ANOVA y el post-test de Bonferroni.

1.4.3 Presencia de la proteína eGFP en tejido hepático

También se evalúa la traducción de la proteína en el tejido. En esta ocasión, y para obtener la mayor cantidad de proteína pura posible, se mezclan los extractos de las zonas proximal (superior) y distal (inferior) de cada lóbulo en cantidades equivalentes.

Se realiza una detección semicuantitativa de la proteína por mediación de un western blot. La sensibilidad del procedimiento no es suficiente para mostrar la baja cantidad de proteína eGFP presente en las muestras. Los diferentes western blots llevados a cabo (no mostrados) sirven para indicar que la cuantificación se debe hacer con algún procedimiento de muy alta sensibilidad. Encontramos un kit de ELISA especial de alta sensibilidad para la proteína eGFP que nos permite obtener el índice de traducción como resultado cuantitativo. Estos resultados se muestran en la figura 9 y se expresan como número de moléculas de la proteína eGFP por célula. La figura izquierda muestra el índice de traducción de la proteína eGFP cuando la perfusión se lleva a cabo a 10 ml/s y la figura derecha muestra el índice de traducción cuando esta perfusión se realizó a 20 ml/s. Se puede observar que no existen unas diferencias muy marcadas en la expresión de la proteína entre las diferentes condiciones empleadas a excepción de la muestra IM de la perfusión anterógrada a 10 ml/s que resulta significativamente superior ($p < 0.05$) tanto respecto a la anterógrada a 20 ml/s como a la retrógrada a 10 ml/s.

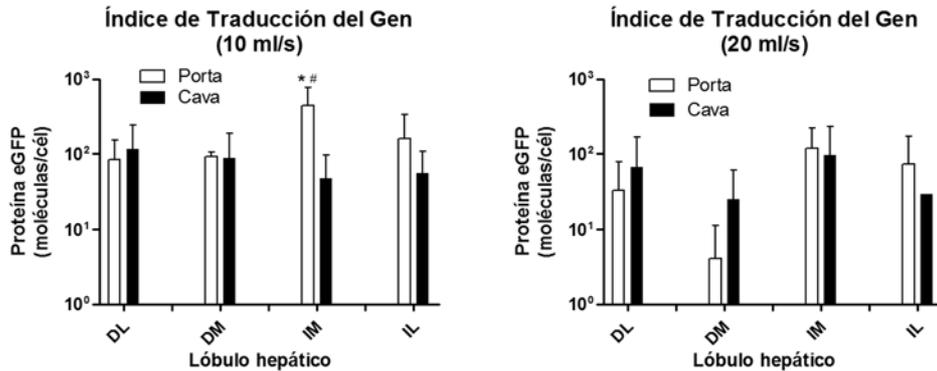


Figura 9. Índice de traducción del gen. Se muestran las medias de los índices de traducción del gen (en promedio de copias de la proteína por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 10 ml/s (izquierda) y 20 ml/s (derecha) por vena porta (vía anterógrada) o por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial. En esta ocasión se unieron los extractos proteicos de las muestras procedentes de las zonas superior e inferior de cada lóbulo hepático en cantidades de proteína equivalentes. *: $p < 0.05$ cuando se compara el sentido de la perfusión con la misma velocidad; #: $p < 0.05$ cuando se compara la velocidad de perfusión utilizando el mismo sentido de inyección. Se utilizó el test estadístico Two-way ANOVA y el post-test de Bonferroni.

1.4.4 Actividad intrínseca de transcripción del gen y elección de condiciones óptimas de eficiencia

El empleo del gen eGFP pretende servir como base para confirmar el interés del procedimiento y ayudar a establecer las mejores condiciones de entrega del gen. Para definir la eficiencia final del procedimiento se podía haber observado las condiciones que mediaban una eficiencia final del proceso de decodificación mayor, es decir el índice de proteína alcanzado. Sin embargo, en nuestro caso no existen diferencias marcadas. Además pensamos que la etapa de traducción debe de depender principalmente de la

capacidad de la célula de traducir el ARN exógeno y que nosotros sólo podemos interferir en que el gen sea entregado a las células diana con la mayor biodisponibilidad para ser transcrito.

A partir de ese punto la maquinaria celular se encarga de traducir el ARN disponible. En este sentido, para identificar las mejores condiciones de transferencia génica se debe encontrar aquel modelo que alcance el máximo aprovechamiento del ADN entregado. Para ello establecemos el parámetro de actividad intrínseca de transcripción, que define la disponibilidad molecular que presenta el ADN que se ha entregado. La actividad intrínseca de transcripción del gen es la relación existente entre los índices de transcripción y de entrega del gen. Se muestran en la figura 10 (figura izquierda para la velocidad de perfusión de 10 ml/s; figura derecha para la velocidad de perfusión de 20 ml/s). A 10 ml/s se observa que en la mayoría de los lóbulos la perfusión retrógrada media una mayor respuesta. A 20 ml/s este hecho se generaliza y se ve incrementado, llegando a ser más de 10 veces superior al alcanzado por vía anterógrada a la misma velocidad. La actividad intrínseca de transcripción de la muestra IM-2 con perfusión retrógrada a 20 ml/s resulta significativamente superior ($p < 0.05$) a la de su homónima con perfusión retrógrada también pero a 10 ml/s. Este parámetro sirve para interpretar que las condiciones de transferencia que entregan con mayor biodisponibilidad el gen corresponden a la perfusión retrógrada de 200 ml de solución salina conteniendo el gen a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y a una velocidad de 20 ml/s.

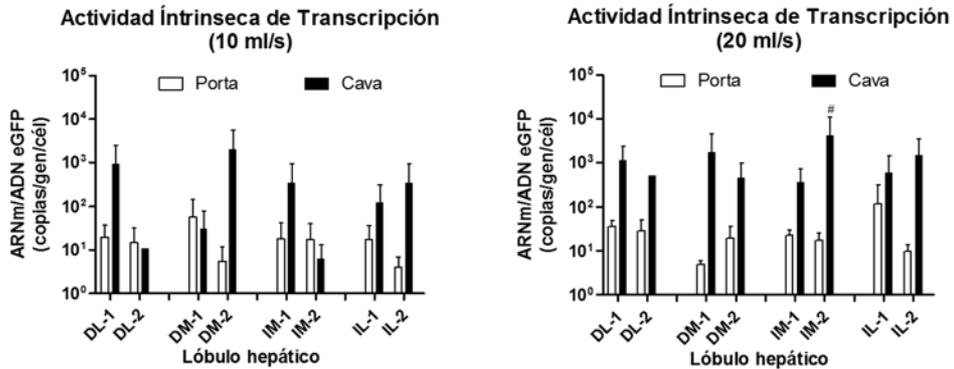


Figura 10. Actividad intrínseca de transcripción del gen. Se muestran las medias de las actividades intrínsecas de transcripción del gen (en promedio de copias del ARNm del gen eGFP por cada copia del gen eGFP y por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 10 ml/s (izquierda) y 20 ml/s (derecha) por vena porta (vía anterógrada) o por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. #: $p < 0.05$ cuando se compara la velocidad de perfusión utilizando el mismo sentido de inyección. Se utilizó el test estadístico Two-way ANOVA y el post-test de Bonferroni.

2. Estudio de la eficiencia de transfección del procedimiento quirúrgico utilizando el gen humano hAAT, con interés terapéutico

Conocidas las condiciones óptimas de transferencia génica para alcanzar la mayor disponibilidad molecular del gen entregado, procedemos a aplicarlas de nuevo pero empleando un gen de interés terapéutico. Se realizan las intervenciones del modo descrito en el procedimiento quirúrgico. La perfusión se lleva a cabo a través de la vena cava a 20 ml/s y a 40 ml/s pero, dado que la velocidad de perfusión de 40 ml/s no aporta ninguna mejora en la eficiencia del procedimiento (datos no mostrados) y supone un riesgo mayor para el animal, decidimos decantarnos definitivamente por la velocidad de 20 ml/s.

En este caso, los animales se eutanizan a los 14 días de la intervención puesto que se conoce que esta construcción génica tarda más tiempo en expresar el gen. Durante estos 14 días se obtienen muestras periódicas de sangre periférica para evaluar la presencia de proteína en plasma. Tras la eutanización, se extrae el hígado y se toman muestras de tejido representativas (superior e inferior) de los lóbulos principales.

2.1 Entrega génica en tejido hepático

En la figura 10 se muestra el índice de entrega del gen hAAT en el tejido hepático. Se muestran las diferentes zonas del órgano (áreas superior e inferior de los lóbulos derecho e izquierdo, mediales y laterales) y la entrega se expresa como número de copias del gen por célula normalizada. El índice de entrega alcanzado resulta muy similar en los diferentes lóbulos y es cercano a una copia cada 100 células. Este índice resulta entre 10 y 100 veces inferior al obtenido con el gen eGFP. Hay que considerar en este caso que la toma de las muestras para la determinación de la entrega se realiza 14 días después de la intervención, por lo que la circulación sanguínea habrá retirado parte del plásmido que no haya entrado en el tejido y el ADN transferido que no haya alcanzado el núcleo habrá sido destruido por las nucleasas.

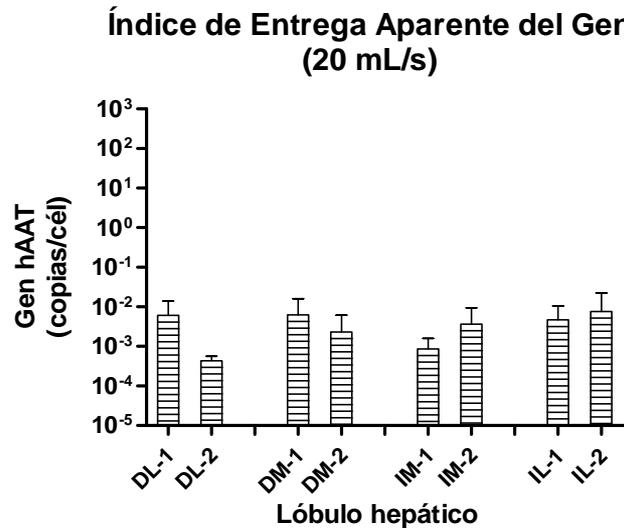


Figura 11. Índice de entrega aparente del gen *hAAT*. Se muestran los índices de entrega aparente del gen (en promedio de copias del gen por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior.

2.2 Concentración de la proteína hAAT en plasma

Una vez confirmado que la entrada del gen ocurre, se debe comprobar que la proteína se está produciendo eficientemente y que además ésta se libera al torrente sanguíneo como ocurre de forma habitual. Para esta determinación, se toman muestras periódicas de sangre en los días 1, 2, 5, 7, 10 y 14 tras la transfección y se cuantifica la proteína hAAT mediante un ELISA específico. En la figura 11 se muestra la presencia de proteína en sangre a lo largo de los 14 días transcurridos entre la transferencia del gen y el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como concentración en ng/ml. Hay que tener en cuenta que la concentración plasmática normal en humanos sanos es del orden

de 0,8-1,2 mg/ml. Se observa cómo la proteína, a pesar de la gran dispersión encontrada, se encuentra durante los 14 días alrededor de los 20 ng/ml. Aparece un pequeño pico de expresión en el día 10 pero el día 14 la proteína prácticamente se hace indetectable. A pesar de que la proteína se expresa y es posible cuantificarla, ésta se encuentra en unos niveles plasmáticos más de 10.000 veces inferiores al considerado terapéutico.

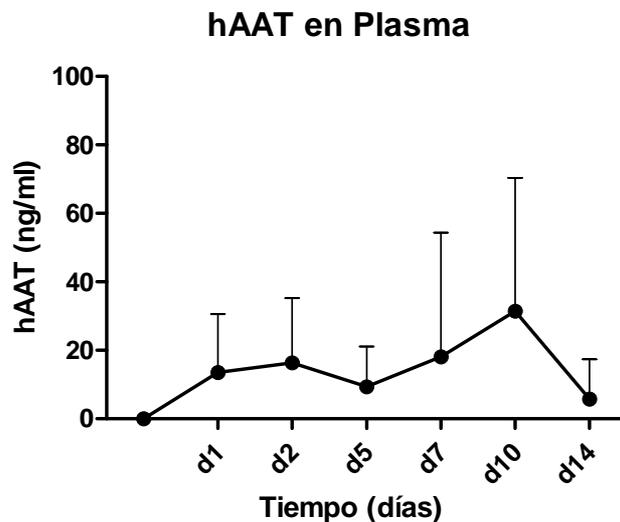


Figura 12. Niveles de hAAT en plasma. Se muestran las concentraciones plasmáticas promedio (con su desviación estándar) de la proteína hAAT (en ng/ml) a diferentes tiempos tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada).

2.3 Transcripción del gen en tejido hepático

La baja presencia de la proteína hAAT en sangre hace pensar que alguna etapa del proceso de decodificación genética está limitando seriamente la eficiencia final del procedimiento. Como no se conoce con exactitud dónde está el cuello de botella, se sigue la misma estrategia de análisis molecular que se siguió con eGFP para conocer lo que ocurre en cada fase del proceso. Siguiendo el orden del proceso de decodificación, el siguiente paso es cuantificar el ARN de hAAT transcrito. La figura 13 muestra el índice de transcripción alcanzado, habiendo tomado las muestras de tejido 14 días tras la transferencia en las diferentes áreas del hígado (proximal y distal de los lóbulos principales). Los datos se expresan como número de copias de ARN del gen hAAT por célula normalizada. El índice de transcripción alcanzado se sitúa entre 1 copia cada 10 células y 1 copia por célula. Estos datos resultan casi 100 veces inferiores al alcanzado con eGFP con las mismas condiciones de transferencia.

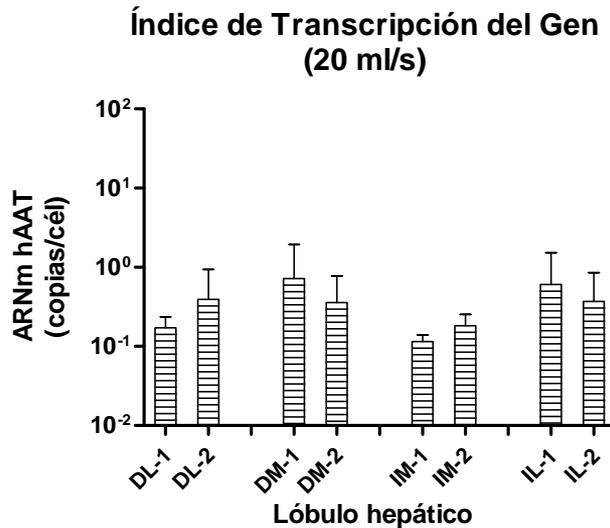


Figura 13. Índice de transcripción del gen *hAAT*. Se muestran los índices de transcripción del gen (en promedio de copias del gen por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. No se encontró ninguna diferencia significativa tras aplicar el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

2.4 Presencia de la proteína hAAT en tejido hepático

El seguimiento del proceso de decodificación nos lleva a la traducción de la proteína humana AAT. Ya se ha visto que ésta alcanza el torrente sanguíneo en unas concentraciones 10,000 veces inferiores a las terapéuticas. La detección y cuantificación de la proteína en el tejido permitiría conocer si la traducción tiene lugar y por alguna razón su liberación al torrente circulatorio se ve limitada. Para ello, tras el sacrificio de los cerdos 14 días después de la intervención se extrae el hígado y se obtiene la proteína de las mismas muestras tisulares representativas (superior e inferior de los lóbulos medial y lateral derechos e izquierdos) utilizadas para el apartado anterior. Los extractos proteicos de las dos

muestras de cada lóbulo se unen en cantidades equivalentes de proteína para que tengan la misma incidencia sobre el total.

2.4.1 Medida semicuantitativa: western blot

Se realiza el western blot de las muestras empleando 50 μg de proteína total. Se emplea como control negativo la muestra de proteína de otro cerdo transfectado con otro gen. Para hacer el estudio semi-cuantitativo de la presencia de proteína se establecen diferentes controles positivos conteniendo cantidades conocidas (1 y 5 ng) de la proteína hAAT pura. Además se añaden como control de la técnica, muestras proteicas de hígados de ratón (25 μg de proteína total) transfectados con el gen *hAAT* en condiciones óptimas (con niveles terapéuticos de la proteína en sangre) y muestras proteicas de hígado humano (5 μg de proteína total) con expresión normal de AAT, ambos considerados “gold standards”, referencias, donde el proceso de decodificación se verifica de forma satisfactoria. Se muestran los resultados de los controles negativos, positivos y las muestras problema en la figura 14. Además de la detección específica de la proteína hAAT, se realiza un control (GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para confirmar que en cada calle electroforética se está añadiendo una cantidad equivalente de proteína total. Las muestras problemas presentan unas marcas de identificación de la proteína equivalentes a 5 ng de proteína pura.

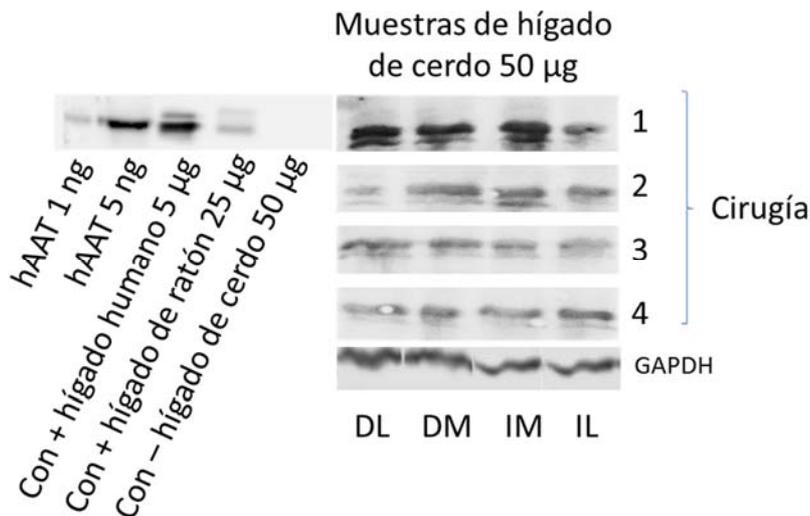


Figura 14. Determinación de hAAT en el tejido hepático por western blot. Se muestra la expresión de la proteína en el tejido de cada lóbulo de hígado cuando la perfusión se lleva a cabo por cierre quirúrgico inyectando 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vía retrógrada. Los controles positivos empleadas son: 1 y 5 ng de la proteína de hAAT pura; homogeneizado de tejido hepático humano (cantidad de proteína total 5 mg); homogeneizado de tejido hepático de ratones transfectadas (cantidad de proteína total 25 mg), produciendo niveles plasmáticos terapéuticos de hAAT. Control negativo: homogenizado de tejido hepático procedente de cerdos transfectados con eGFP. También se representa la expresión de (GAPDH) como control interno. Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial.

2.4.2 Medida cuantitativa: ELISA

Para cuantificar con mayor exactitud la expresión de la proteína hAAT en el tejido se realiza un ELISA específico sobre el extracto proteico de cada muestra individualizada (superior e inferior por separado). La figura 15 muestra el índice de traducción de la proteína. Los resultados se expresan como número de moléculas de la proteína por célula normalizada. Para ello, la cantidad de proteína hAAT en cada muestra se relacionó con su contenido de

proteína total. La cantidad de proteína observada resulta ser muy homogénea por todo el hígado. Además el índice alcanzado fue de hasta 10^6 de copias por célula.

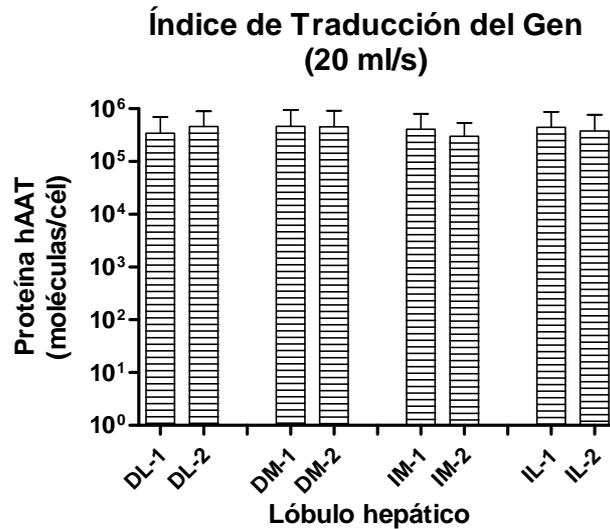


Figura 15. Índice de traducción del gen *hAAT*. Se muestran los índices de traducción del gen (en promedio de copias de la proteína por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con cierre vascular mediado por cirugía. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior.

3. Transferencia génica hepática del gen hAAT, mediada por cateterismo en cerdo

3.1 Procedimiento de cateterismo abierto

Con el procedimiento de transferencia génica hepática en cerdos mediada por cirugía se alcanza una producción eficiente de la proteína en tejido. El índice de traducción en el tejido es similar al obtenido en los ratones transfectados que sí logran una expresión plasmática terapéutica de la proteína. Sin embargo, estos niveles de proteína no son comparables en el plasma de los cerdos. En ese punto, la idea es desarrollar un procedimiento mínimamente invasivo que pueda imitar al anterior, siendo lo más inocuo posible. Por ello, se establece una estrategia de cateterismo, con la ayuda de los radiólogos intervencionistas, para dirigir la perfusión del gen al hígado a través de una rama suprahepática de la vena cava.

El procedimiento consiste en emplazar un catéter de 8 Fr con balón en una rama suprahepática de la vena cava y perfundir la solución génica localmente. El catéter se introduce a través de la vena yugular y, guiado por unas guías especiales y Rx, alcanza un lóbulo del hígado. Una vez situado en la rama suprahepática, se hincha el balón y se inyecta en sentido retrógrado una solución de contraste yodada, con el fin de confirmar el área de perfusión y el cierre vascular por parte del balón.

En la figura 16 se muestran un esquema del hígado con la posición del catéter con balón (figura 16A) y unas imágenes radiológicas representativas del procedimiento (figura 16B). En el esquema se puede observar la localización del catéter con balón. En la imagen se muestra el catéter con el balón hinchado de aire (flecha negra) y la solución de contraste yodada marcando el área de perfusión

en dos ramas suprahepáticas de la vena cava (HV). Se confirma que el balón es capaz de cerrar completamente el retorno vascular. Cuando todo está dispuesto y la zona de perfusión confirmada, se inyectan 200 ml de solución génica conteniendo el gen *hAAT* a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 20 ml/s.

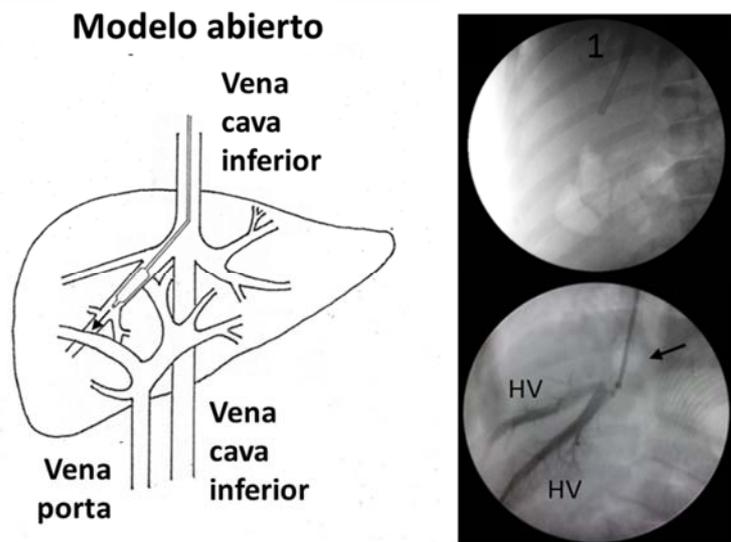


Figura 16. Modelo de transferencia génica hepática mediada por cateterismo abierto. En la figura izquierda se muestra esquemáticamente la vascularización venosa hepática principal. Se puede observar la posición del catéter en la vena cava para realizar la perfusión por vía retrógrada, la flecha indica el sentido de la inyección. En la figura derecha se muestran dos imágenes de Rx. En la imagen superior se observa la posición del catéter (1) antes de la inyección. En la imagen inferior se muestra el área de perfusión tras hinchar el balón (flecha negra) del catéter e inyectar solución de contraste yodado. HV= vena hepática (cava).

3.2 Procedimiento de cateterismo cerrado

Paralelamente, también desarrollamos otro procedimiento de transferencia génica hepática que se encuentra entre el cateterismo abierto y la cirugía respecto a lo invasivo que resulta el procedimiento para el animal. Consiste en un cateterismo por medio del cual conseguimos un cierre casi completo del órgano (todos los vasos a excepción de la arteria), con el que se puede transferir el gen a todo el hígado sin la necesidad de practicar una laparotomía. Aunque menos invasivo, el procedimiento no resulta inocuo puesto que necesita de un cateterismo transhepático para conseguir cerrar la vena porta. El procedimiento consiste en emplazar dos catéteres con balón en la vena cava a la altura de la entrada del hígado para limitar la transferencia al hígado sin posibilidad de retorno a través de la vena cava. El catéter para la perfusión (introduccionador de 8 Fr con balón, preparado para este propósito) se introduce por la vena yugular. El catéter con balón (10 Fr) para el bloqueo de la vena cava infrahepática se introduce por la vena femoral. Paralelamente, se introduce otro catéter de 10 Fr con balón a través del hígado hasta alcanzar la rama principal de la vena porta. Para situar los catéteres en su emplazamiento correcto nos servimos de guías radiológicas, Rx y un ecógrafo. Cuando todos los catéteres están en su lugar, se hinchan todos los balones y se inyecta un pequeño volumen de solución de contraste yodada que permite verificar que todos los balones cierran la circulación en su vaso y confirmar el área de perfusión. Cuando todo está dispuesto y confirmado, se inyectan 200 ml de solución génica conteniendo el gen *hAAT* en una concentración de 20 µg/ml

a 20 ml/s. En la figura 17 se muestra esquemáticamente el hígado con la disposición de los catéteres (imagen superior) e imágenes de Rx representativas del procedimiento. En la imagen izquierda de la fila superior de la figura imagen inferior se observa cómo, mediante una guía, se localiza la rama principal de la vena porta en el hígado. La imagen central de la misma fila muestra la confirmación del vaso mediante la inyección de solución de contraste. En la imagen de la derecha se observa cómo la guía ha sido sustituida por el catéter con balón y se confirma mediante solución de contraste que éste es capaz de cerrar el flujo venoso en la vena porta. En las imágenes de Rx de la fila inferior se muestra la posición de los catéteres en la entrada de la vana cava en el hígado (izquierda) y la confirmación del área de perfusión con todos los balones hinchados. Se puede observar mediante la inyección de solución de contraste que la solución perfundida alcanza ambos lados del órgano. Cuando todo está dispuesto y la zona de perfusión confirmada, se inyectan 200 ml de solución conteniendo el gen *hAAT* en una concentración de 20 µg/ml a 20 ml/s.

Modelo cerrado

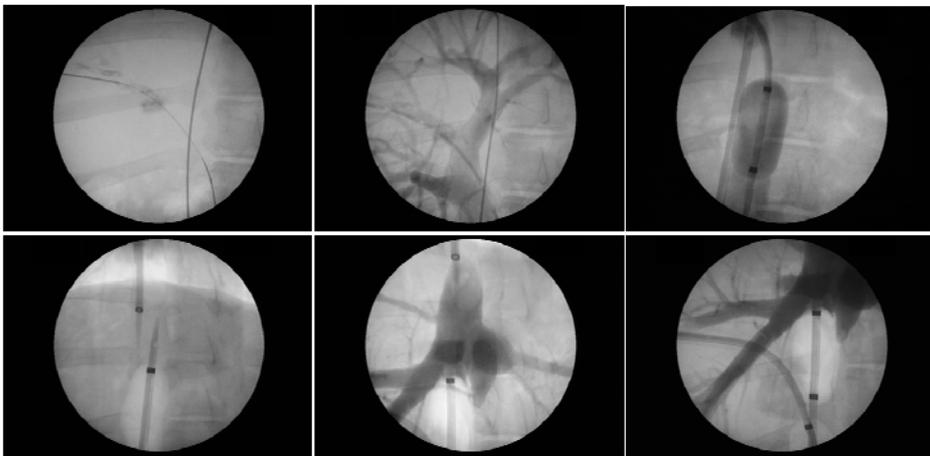
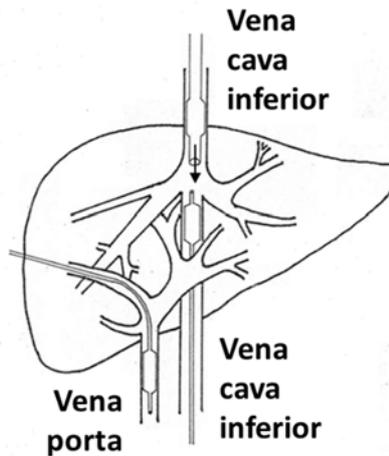


Figura 17. Modelo de transferencia génica hepática mediada por cateterismo cerrado. En la imagen superior se muestra esquemáticamente la vascularización venosa principal del hígado. Se puede observar la posición de los diferentes catéteres con balón. Se disponen 2 catéteres en la vena cava (supra e infrahepáticamente) para limitar la entrada de la solución génica. Paralelamente se dispone otro catéter en la vena porta. El sentido de la inyección (flecha negra) es también retrógrado a través del catéter dispuesto en la vena cava suprahepática. En la imagen inferior se muestran seis imágenes de Rx. En la fila superior se observa la colocación del catéter portal y la confirmación del cierre completo de la vena mediante la inyección de solución de contraste. En la fila inferior se muestra la disposición de los catéteres en la vena cava y la confirmación del área de perfusión tras hinchar todos los balones e inyectar solución de contraste yodado.

3.3 Determinación de AST y ALT en sangre

Para confirmar la seguridad de ambos procedimientos y descartar un daño severo en el hígado, se toman muestras a tiempo 0 (basal), 1 hora, 1 día, 2 días y 5 días tras la intervención y se cuantifican las principales transaminasas hepáticas. En la figura 18 se muestran y comparan los niveles de las enzimas AST (figura izquierda) y ALT (figura derecha). La concentración de ambas enzimas se expresa como unidades internacionales (U/I).

Se observa que ambos procedimientos aumentan los niveles de AST. En el procedimiento abierto este aumento es ligero y tiene tendencia a normalizarse el quinto día tras la intervención. El cateterismo cerrado media una respuesta más marcada y mantenida en el tiempo pero nunca alcanza unos niveles que pudieran suponer un riesgo para el animal. En el caso de la ALT, el cateterismo abierto apenas modifica los niveles basales. Sin embargo, el procedimiento cerrado induce un incremento en los niveles de la enzima pero sin alcanzar nunca niveles que pudieran comprometer la seguridad del animal.

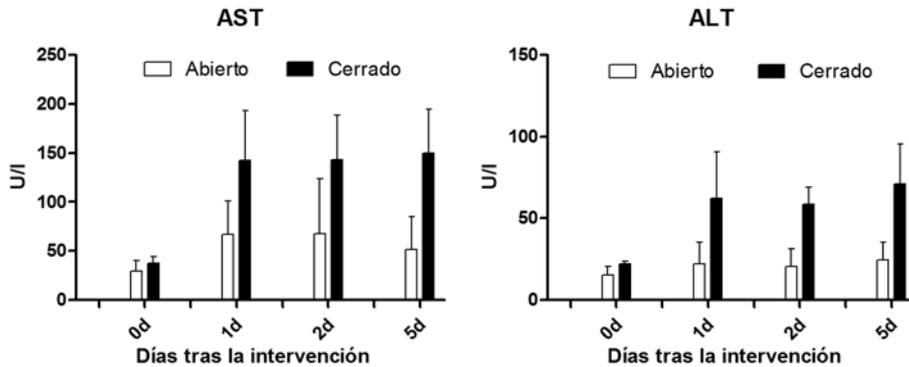


Figura 18. Daño hepático tras transferencia génica hepática mediada por cateterismo. En la figura se muestran los niveles de las principales enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa, figura izquierda; y alanina aminotransferasa, figura derecha), con su desviación estándar, a diferentes tiempos (0 horas=basal; 1, 2 y 5 días tras la intervención). Se comparan los niveles alcanzados en los dos modelos de perfusión, abierto y cerrado, tras la inyección de 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vía retrógrada.

3.4 Análisis molecular

En ambos procedimientos, los cerdos son despertados y mantenidos en estabulación durante un periodo de 14 días durante los cuales se toman muestras periódicas de sangre (días 1, 2, 5, 7, 10 y 14) para la cuantificación de la proteína hAAT plasmática. Transcurrido este periodo, los cerdos son eutanizados y el hígado extraído. Se toman dos muestras de tejido representativas (superior e inferior) de cada uno de los lóbulos principales (derecho e izquierdo, mediales y laterales) para la determinación de la entrega génica, la transcripción del gen y la traducción de la proteína. Los resultados obtenidos con cada procedimiento son comparados.

3.4.1 Entrega génica en tejido hepático

En la figura 19 se muestra el índice de entrega aparente del gen *hAAT* en las muestras tomadas de las diferentes áreas del hígado después de la transferencia génica mediada por los cateterismos abierto y cerrado. Los datos se expresan como número de copias del gen *hAAT* por célula normalizada. Se puede observar que el índice de entrega génica mediado por el procedimiento de cateterismo cerrado resulta muy superior en todos los lóbulos alcanzado con el cateterismo abierto. Cuando se compara el global del órgano, la tasa de entrega génica es significativamente superior (hasta 1000 veces; $p < 0.01$). El cateterismo cerrado permite la entrada de hasta una copia del gen por célula, valor que se acerca al esperado para un gen endógeno. Resulta reseñable que en el cateterismo abierto la entrega del gen llega a todo el órgano a pesar de que la transferencia es localizada en un lóbulo.

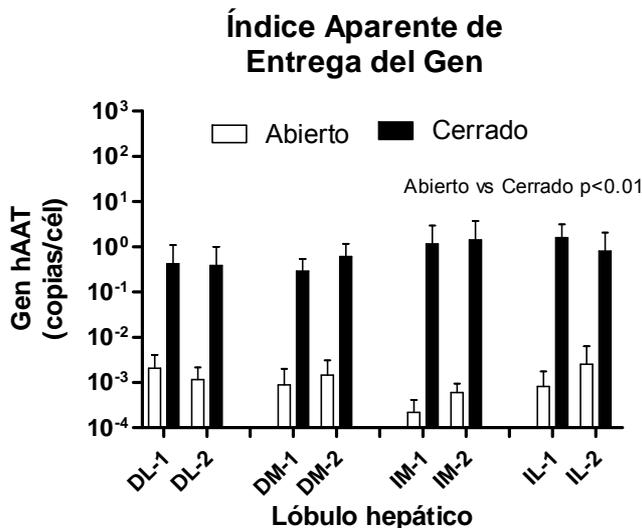


Figura 19. Índice de entrega aparente del gen *hAAT* tras la transferencia génica hepática mediada por cateterismo. Se muestran los índices de entrega aparente del gen (en promedio de copias del gen por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con y sin cierre vascular mediado por cateterismo. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. Se encuentra diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los dos grupos tras aplicar el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.2 Concentración de la proteína *hAAT* en plasma

Del mismo modo que se ha hecho en el modelo quirúrgico, tras confirmar que la entrega del gen sucede, se determina la expresión plasmática de la proteína *hAAT*. En la figura 20 se muestra la concentración de la proteína a lo largo de los 14 días transcurridos entre la transferencia génica y el sacrificio de los animales. Se comparan los valores alcanzados tras la perfusión por cateterismo abierto y por cateterismo cerrado. Los datos se expresan como concentración en ng/ml.

La concentración plasmática de proteína presente a lo largo de este periodo de 14 días resulta, a pesar de la dispersión

encontrada, siempre superior tras la transferencia génica mediada por cateterismo cerrado. El cateterismo cerrado llega a alcanzar un pico en el día 5 cercano a los 60 ng/ml mientras que con el cateterismo abierto no se pueden superar los 20 ng/ml en su máximo. En el modelo de cateterismo abierto resulta imposible siquiera detectar la presencia de la proteína en las muestras de algunos días. Las concentraciones de hAAT plasmática de ambos procedimientos están muy alejadas (10.000 veces inferiores) de los niveles considerados terapéuticos (0.8-1.2 mg/ml).

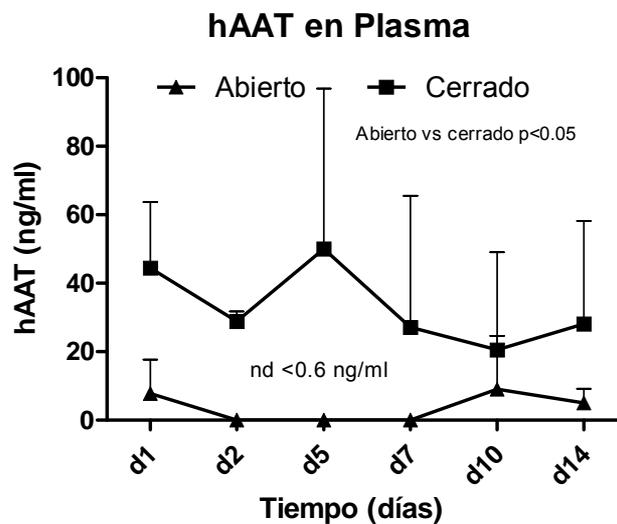


Figura 20. Niveles de hAAT en suero tras la transferencia génica hepática mediada por cateterismo. Se muestran las concentraciones plasmáticas promedio (con su desviación estándar) de la proteína hAAT (en ng/ml) a diferentes tiempos tras la transferencia génica con y sin cierre vascular mediado por cateterismo. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Se encuentra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos grupos tras aplicar el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney. nd= no detectable.

3.4.3 *Transcripción del gen en tejido hepático*

Transcurridos 14 días desde la intervención, se eutanizan los animales, se extraen los hígados y se obtienen muestras de tejido significativas de todo el órgano. Se determina el índice de transcripción del gen hAAT. En la figura 21 se comparan los índices de transcripción alcanzados tras la transferencia génica por los procedimientos abierto y cerrado. Los valores se muestran como número de copias de ARNm del gen *hAAT* por célula normalizada. Se puede observar como la distribución de la transcripción es muy uniforme a lo largo del hígado tanto en el procedimiento abierto como en el cerrado. El cateterismo cerrado alcanza índices significativamente superiores ($p < 0.001$) a los del cateterismo abierto en todo el órgano, llegando a ser hasta 1.000 veces superior.

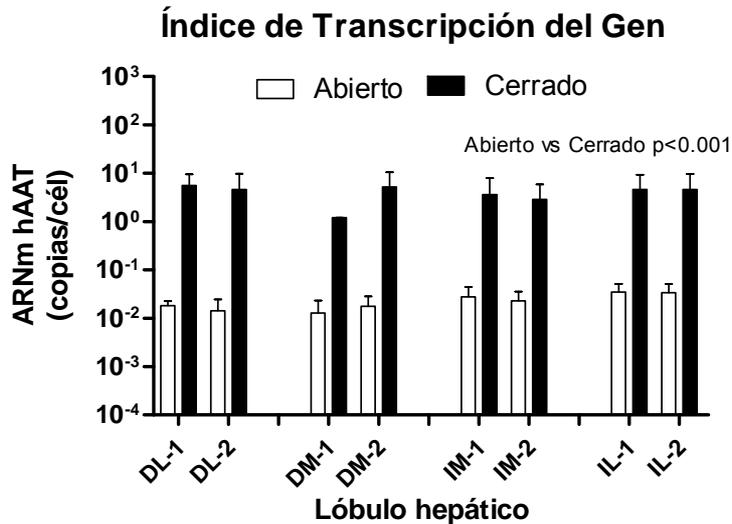


Figura 21. Índice de transcripción del gen *hAAT* tras la transferencia génica hepática mediada por cateterismo. Se muestran los índices de transcripción del gen (en promedio de copias de ARNm del gen por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con y sin cierre vascular mediado por cateterismo. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los dos grupos tras aplicar el test estadístico t-test no paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.4 Presencia de la proteína *hAAT* en tejido hepático

La presencia de la proteína *hAAT* también se determina en el hígado en las mismas muestras de tejido. Se confirma la presencia de la misma por 3 métodos diferentes: western blot (semicuantitativo), ELISA (cuantitativo) e inmunohistoquímica (cualitativo y espacial).

3.4.4.1 Medida semicuantitativa: western blot

Se realiza un western blot utilizando muestras de tejido homogenizadas y se realiza la detección de la proteína por medio de unos anticuerpos específicos (figura 22). Se utilizan como controles positivos: proteína *hAAT* purificada (1 y 5 ng), tejido

hepático homogenizado procedente de segmentos hepáticos humanos (5 µg) y tejido hepático homogenizado procedente de ratones transfectados bajo las condiciones óptimas (25 µg), que conduce a niveles plasmáticos terapéuticos de la proteína en plasma. Como control negativo, se carga un homogenizado de tejido hepático de cerdo (50 µg) transfectado con otro gen. Se cargan 4 muestras del hígado de cada cerdo transfectado. Cada muestra corresponde a cada uno de los lóbulos principales del hígado (derechos lateral y medial e izquierdos lateral y medial) y para ello se unen las muestras procedentes de las partes superior e inferior de cada lóbulo en cantidades equivalentes de proteína total.

De este modo se puede evaluar la proteína presente en todo el órgano. Se realiza un control de carga con la detección de la proteína GAPDH. Se puede observar la detección específica de la proteína en los controles positivos y la falta de reactividad cruzada en los negativos. Las muestras resultan positivas en prácticamente todos los casos llegando a alcanzar señales similares a las obtenidas por la proteína pura y en el control humano. Se puede apreciar que el cateterismo cerrado alcanza unos niveles de proteína hAAT en tejido mayores que los alcanzados con el procedimiento abierto.

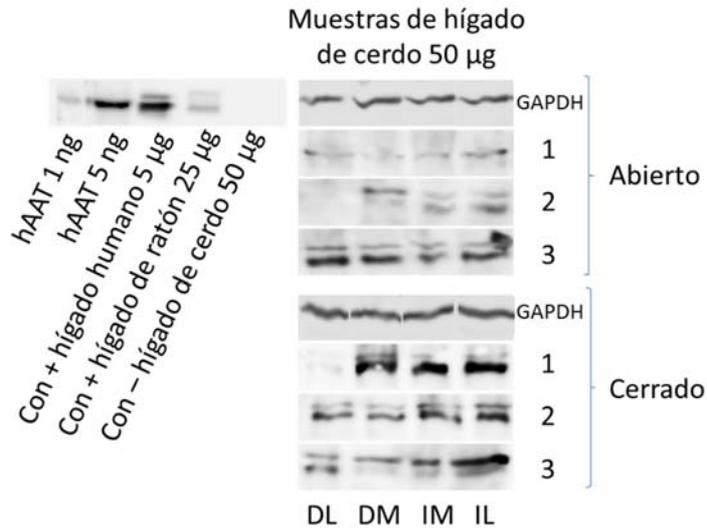


Figura 22. Determinación de hAAT en el tejido hepático por Western blot tras transferencia génica hepática mediada por cateterismo. Se muestra la expresión de la proteína en el tejido de cada lóbulo de hígado cuando la perfusión se lleva a cabo con y sin cierre vascular mediado por cateterismo, inyectando 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vía retrógrada. Los controles positivos empleadas son: 1 y 5 ng de la proteína de hAAT pura; homogeneizado de tejido hepático humano (cantidad de proteína total 5 mg); homogeneizado de tejido hepático de ratones transfectados (cantidad de proteína total 25 mg), produciendo niveles plasmáticos terapéuticos de hAAT. Control negativo: homogeneizado de tejido hepático procedente de cerdos transfectados con eGFP. También se representa la expresión de (GAPDH) como control interno. Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial.

3.4.4.2 Medida cuantitativa: ELISA

Como modo de confirmación de la presencia de la proteína en tejido y la determinación cuantitativa de la misma, se lleva a cabo el ELISA con anticuerpos específicos para hAAT. Para ello, se toman muestras de tejido homogenizadas procedentes de las mismas áreas representativas del hígado (8 por órgano). En la figura 23 se comparan los índices de traducción del gen

alcanzados tras la transferencia génica mediada por los procedimientos abierto y cerrado. Los datos se expresan como número de moléculas de la proteína hAAT por célula normalizada. Se puede observar que la distribución de la presencia de la proteína es homogénea a lo largo del hígado. El índice de traducción del gen es significativamente superior ($p < 0.01$) tras la transferencia génica por el procedimiento cerrado con unos niveles de hasta 10^5 moléculas de la proteína por célula normalizada.

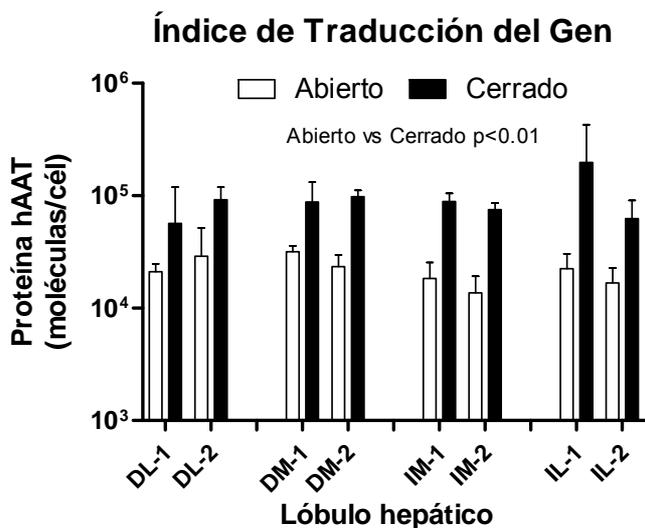


Figura 23. Índice de traducción del gen *hAAT* tras la transferencia génica hepática mediada por cateterismo. Se muestran los índices de traducción del gen (en promedio de copias de la proteína por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de diferentes áreas del órgano tras la transferencia génica con y sin cierre vascular mediado por cateterismo. Se emplean las condiciones: 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). Áreas del hígado en las que se toman muestras: D=lóbulo derecho, I=lóbulo izquierdo; L=lateral, M=medial; 1=superior, 2=inferior. Se encuentra diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los dos grupos tras aplicar el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

3.4.4.3 Presencia y distribución de la proteína en tejido por inmunohistoquímica

Se toman muestras de tejido de los cerdos transferidos por el procedimiento de cateterismo cerrado, que ha mediado el mayor índice de traducción de la proteína en tejido, y se determina la presencia de hAAT con unos anticuerpos específicos.

La figura 24 muestra la inmunohistoquímica para hAAT en tejido hepático de cerdo control (transfectado con otro gen; a), muestras problema (procedentes de 3 cerdos diferentes transfectados por cateterismo cerrado; b-d), tejido hepático de ratón transfectado con hAAT (10x, e; 20x, f) y tejido hepático humano de un paciente con expresión normal de hAAT (10x, g; 20x, h).

En las muestras de los controles positivos se observa un marcaje fuerte de la proteína hAAT. En el tejido humano, la distribución de la proteína es homogénea a lo largo del tejido con alguna área más marcada. Sin embargo, en las muestras de ratón esta distribución es más irregular, mostrándose grupos de células con una fuerte tinción (5-10 %) frente a otras células sin apenas presencia de proteína. Esto ocurre también en las muestras problema de cerdo aunque con menor intensidad.

Se observan diferentes marcas positivas de la proteína hAAT (flechas negras) en aproximadamente el 3-5 % de las células. Mientras que la distribución de la proteína hAAT constitutiva en tejido hepático humano es principalmente periportal, en los cerdos y ratones transfectados ésta se encuentra principalmente en áreas perivenosas (vena central), lo que corresponde con la vía de entrada del gen.

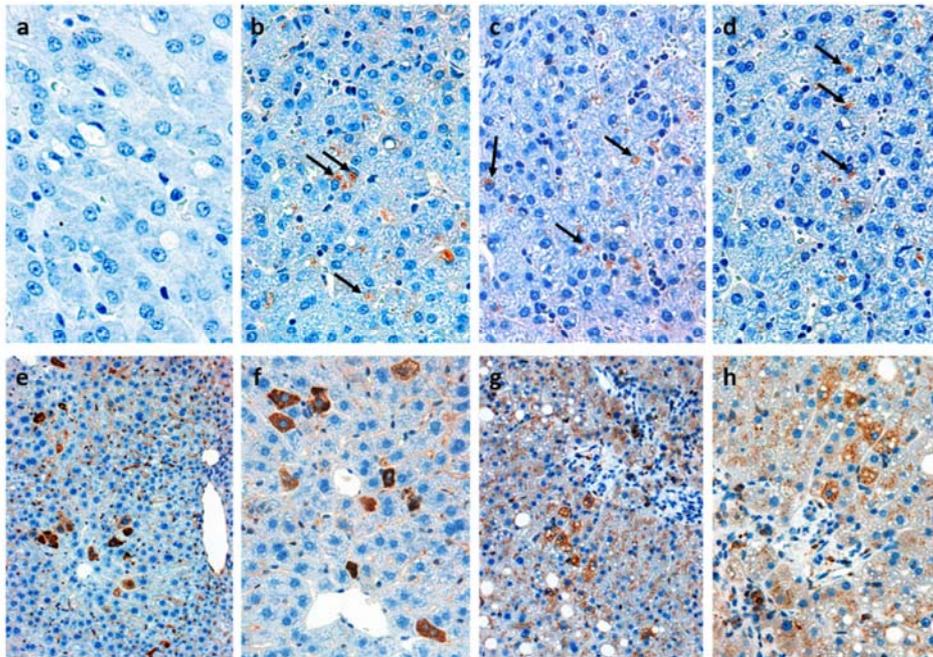


Figura 24. Inmunohistoquímica de hAAT. Tinción de tejido hepático procedente de cerdos no transfectados con hAAT (a, 40x) frente a cortes tisulares hepáticos procedentes de cerdos transfectados empleando cateterismo cerrado (b, c y d; 40x). Se muestra también la tinción de la proteína hAAT en secciones de hígado de ratones transfectados (e, 20x; f, 40x); Se muestra también la inmunotinción de hAAT en secciones tisulares procedentes de hígado humano (g, 20x; h, 40x). Las flechas negras indican reacción inmunohistoquímica específica contra la proteína hAAT en muestras de cerdos. El tejido se contrasta con hematoxilina.

3.5 Eficacia comparativa de la transferencia génica mediada por catéter y cirugía en cerdo con respecto a los modelos de referencia: ratón transfectado y segmento hepático Humano

3.5.1 Proceso de decodificación del gen hAAT y exportación de la proteína

Se determinan los índices promedio de entrega (o presencia cuando se trata de tejido humano), transcripción y traducción del gen *hAAT* en las muestras de tejido considerado patrón. Se toman muestras de segmentos hepáticos humanos de pacientes con expresión normal de hAAT y muestras de hígado de ratones a los que se les ha transferido el plásmido con el gen *hAAT* bajo las condiciones óptimas de perfusión hidrodinámica. Estos valores de ADN, ARN y proteína (en tejido y sangre) se comparan con los alcanzados en el cerdo tras la transferencia del gen *hAAT* siguiendo el procedimiento quirúrgico y los cateterismos abierto y cerrado.

En la figura 25 se muestra los valores de los parámetros del proceso de decodificación del gen *hAAT* en los modelos patrón (A) y en las muestras problema del cerdo (B). Los índices de entrega (o presencia, en tejido humano) de ADN, transcripción y traducción del gen se expresan en número de copias por célula normalizada cuando se trata del tejido y en concentración ($\mu\text{g/ml}$) cuando se evalúa la presencia de la proteína en sangre periférica. Los resultados muestran cómo el proceso de decodificación del gen *hAAT* en los modelos de referencia (A) sigue una relación lineal en tejido ($r > 0.99$ tanto en ratón como en humano) del número de copias de ADN, ARN y proteína. Se observa un comportamiento

muy similar en ambos modelos, a pesar de que el ratón está decodificando un gen heterólogo. En el caso del modelo porcino (B), esta relación lineal en el proceso de decodificación génica en el tejido no ocurre en ningún caso ($r=0.85$ para el modelo de cateterismo cerrado, $r=0.87$ para el modelo de cateterismo abierto y $r=0.92$ para el modelo quirúrgico), sea cual sea el procedimiento de transferencia génica, lo que sugiere la existencia de una limitación que reduce la eficiencia del proceso de decodificación. Esta limitación se observa principalmente en la etapa de transcripción del gen.

En el modelo murino se muestra que, con una entrega del gen inferior a 1 copia cada 100 células normalizadas de promedio, se alcanzan niveles supraterapéuticos de la proteína hAAT en sangre ($3962.2 \pm 1778.9 \mu\text{g/ml}$). En el modelo porcino, mientras que el procedimiento de cateterismo abierto y el quirúrgico ofrecen un índice de entrega génica inferior a los controles, el procedimiento de cateterismo cerrado media un índice de entrega del gen 100 veces superior al del ratón. A pesar de esta eficiente entrega, los índices de traducción de la proteína hAAT en tejido (94762.6 ± 17585.4 copias/célula) son inferiores a los alcanzados en el ratón (398618.3 ± 199218.8 copias/célula) y a los presentes constitutivamente en el hígado humano (5099000 ± 217419 copias/célula). Por el contrario, la entrega génica mediada por el procedimiento quirúrgico media una traducción proteica en el tejido (408082.5 ± 385938.1 copias/célula) superior a la presente en el hígado de los ratones transfectados e incluso muy cercana a la del tejido humano control (10 veces inferior). Sin embargo, mientras

que en el modelo murino y en los pacientes sanos la concentración de la proteína hAAT en sangre periférica es superior a 1 mg/ml, en el cerdo sólo se alcanzan concentraciones de hasta 60 ng/ml, en el mejor de los casos, 14 días después de la transferencia. Los procedimientos de entrega génica mediada por cateterismo abierto y cerrado alcanzan unos índices de entrega 10 y 1.000 veces superiores a los observados tras el procedimiento quirúrgico, respectivamente. Sin embargo, la concentración plasmática final de la proteína hAAT es prácticamente idéntica en los 3 procedimientos.

Además, mientras que la diferencia en la presencia de la proteína hAAT en tejido hepático de cerdo fue 5-10 ó 50 veces inferior a las observadas en los controles de ratón transfectado y humano respectivamente, la concentración plasmática en cerdo fue 10000 veces inferior. Este dato sugiere la existencia de una limitación en el proceso de exportación de la proteína al exterior de la célula, llegándose a observar significación estadística ($p < 0.001$) al comparar las diferencias existentes entre los niveles de proteína en tejido y en sangre del patrón de referencia (ratón) con respecto a la observada en cerdo, utilizando cualquier procedimiento de transferencia.

Hidrofección hepática no viral

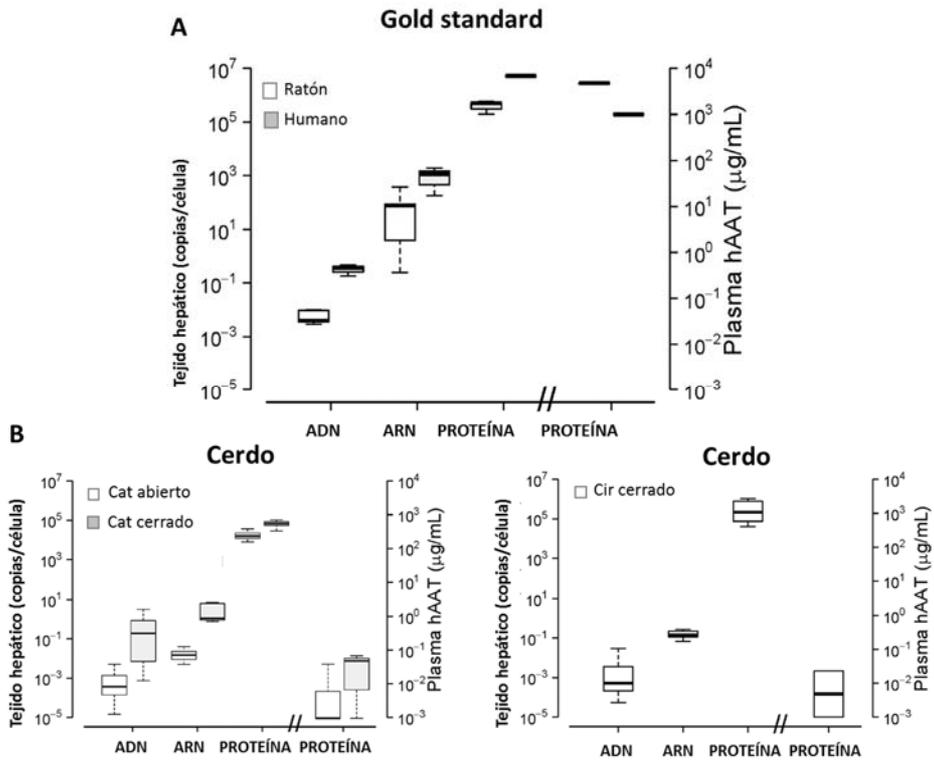


Figura 25. Comparativa del proceso de decodificación del hAAT en tejido hepático de ratón, cerdo y humano. Se muestran los índices de traducción, transcripción y traducción del gen (en promedio de copias del gen, el ARNm y la proteína por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de ratón transfectado bajo condiciones óptimas y procedentes de humanos, como control (figura 25A). En la figura 25B se muestran estos mismos índices obtenidos en cerdo tras la transferencia génica sin y con cierre vascular mediado por cateterismo y cirugía de 200 ml de solución génica a 20 ml/s por vena cava (vía retrógrada). También se muestra la concentración plasmática de la proteína hAAT en los diferentes modelos (en $\mu\text{g/ml}$). Test estadístico: modelo mixto de análisis de la varianza. Se observa significación estadística ($p < 0.001$) al comparar las diferencias existentes entre proteína en tejido y en sangre del patrón de referencia (ratón) con respecto a la observada en cualquier procedimiento en cerdo.

3.5.2 Estudio dosis-respuesta del proceso de decodificación en el modelo gold standard (ratón)

Se observa en el modelo porcino que cuanto mayor es la entrega de ADN, menor es el incremento relativo del índice de transcripción. Además, el mayor índice de traducción de la proteína hAAT en tejido que se obtiene corresponde con el procedimiento de transferencia con menor índice de entrega. Estos datos sugieren que debe existir una actividad compensatoria en el proceso de decodificación.

Para determinar la existencia y en su caso el margen de compensación interna del sistema, se realiza un estudio dosis-respuesta empleando el gen *hAAT* en el modelo hidrodinámico murino (gold standard) y se analizan la entrega, la transcripción y la traducción del gen en tejido hepático. Para ello se inyectan diferentes concentraciones de plásmido con el gen *hAAT* (5, 20, 80 y 320 $\mu\text{g/ml}$), siguiendo el procedimiento habitual de transferencia hidrodinámica en ratón. Los índices de entrega, transcripción y traducción tisular obtenidos tras la transferencia de las distintas concentraciones del plásmido se muestran en la figura 26.

La dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 26 A) resulta en un índice de entrega de 1 copia cada 1.000 células aproximadamente y el proceso de decodificación genética tiene una respuesta lineal ($R=0.9993$) alcanzando un índice de traducción de cerca de 1.000.000 de moléculas de la proteína por célula normalizada.

La dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$, considerada óptima en base a los experimentos previos del grupo, se confirmó como tal (Fig. 26 B): alcanza una mayor entrega (1 copia cada 100 células) y traducción

del gen (aproximadamente 500.000 copias por célula). También obtiene una respuesta lineal ($R=0.9997$) en el proceso de decodificación, indicando que la maquinaria celular está operando en condiciones proporcionadas.

Sin embargo, cuando la dosis de plásmido empleada es de 80 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 26 C) observamos que, a pesar de que la entrega del gen y su traducción son mayores que las obtenidas con dosis menores, el proceso pierde en parte su linealidad (0.9733), aun alcanzando un índice de traducción elevado.

Esta pérdida de linealidad ocurre de una manera más marcada cuando empleamos la dosis de 320 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 26 D), que alcanza una entrega génica de más de 100 copias por célula. En este caso, incluso se observa como la traducción de la proteína es menor a la alcanzada con 80 $\mu\text{g/ml}$ a pesar de tener un índice de transcripción más de 10 veces superior. Estos resultados ponen de manifiesto, en el modelo gold standard, la existencia de un proceso de contrarregulación de la expresión del gen ya sea por bloqueo, por saturación o por otro motivo que limita la eficacia final del procedimiento.

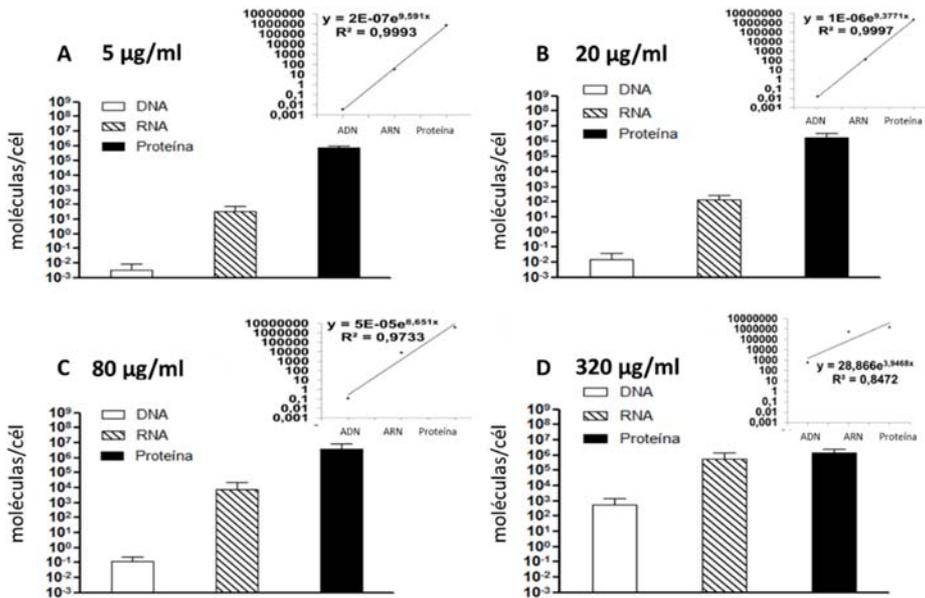


Figura 26. Estudio dosis-respuesta del proceso de decodificación del hAAT en tejido hepático de ratón. Se muestran los índices de traducción, transcripción y traducción del gen (en promedio de copias del gen, el ARNm y la proteína por célula normalizada, con su desviación estándar) en tejido hepático procedente de ratón transfectedo bajo condiciones óptimas de transferencia a diferentes dosis del plásmido. A: 5 $\mu\text{g/ml}$; B: 20 $\mu\text{g/ml}$; C: 80 $\mu\text{g/ml}$; D: 320 $\mu\text{g/ml}$. En la esquina superior derecha de cada gráfico se muestra la ecuación que describe la relación existente entre las 3 especies (ADN, ARNm y proteína) para cada dosis.

4 Distribución de nanopartículas de oro (4 y 15 nm) en el tejido hepático de cerdo tras inyección hidrodinámica

Con la intención de determinar cómo se distribuye una partícula en el tejido hepático tras ser inyectado hidrodinámicamente y observar las barreras biológicas que puedan o no franquearse, inyectamos nanopartículas de oro de 4 nm (por ser un tamaño próximo al de un plásmido) y 15 nm de diámetro. Hay que tener en cuenta que en la síntesis de nanopartículas, el diámetro exacto de éstas sigue una distribución gaussiana. En este sentido podemos tener Nps abarcando un rango de entre 2 y 20 nm. Esto es muy

importante a la hora de definir con precisión la distribución diferencial de éstas en un tejido biológico.

Se inyectan 200 ml de solución a 20 ml/s por la vena cava siguiendo dos de los procedimientos descritos para la hidrofección. Transcurridos 5 minutos de la inyección permitiendo que el órgano se lave ligeramente, se inyecta solución de glutaraldehído para fijar el órgano.

Utilizamos el procedimiento quirúrgico y el cateterismo abierto por estar en los dos extremos en cuanto a exigencia hidrodinámica de la inyección, menos y más brusca, respectivamente. Esto permite comparar cómo se afecta el tejido y si se da una distribución diferencial de las partículas. En la figura 27 se observan unas imágenes del tejido hepático tras la inyección hidrodinámica de las Nps vistas bajo el microscopio electrónico de transmisión.

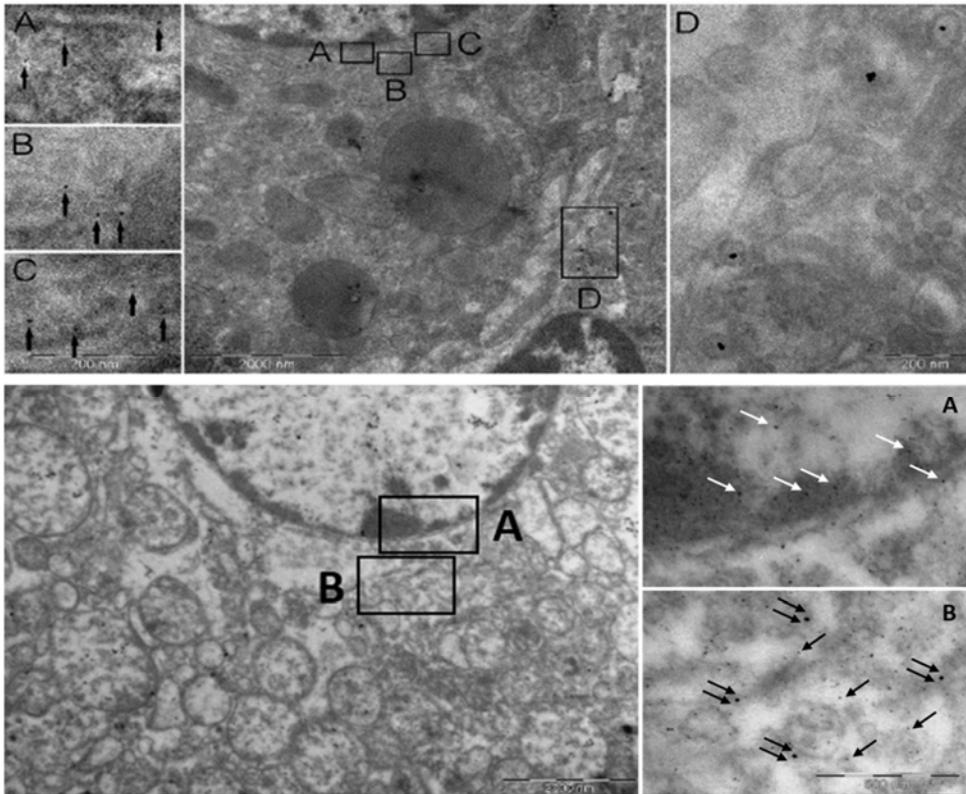


Figura 27. Distribución de las nanopartículas de oro en los hepatocitos. Se inyectan 200 ml de una solución tamponada con ácido cítrico que contiene nanopartículas (Nps) de oro con un diámetro de 4 nm y 15 nm (10^{12} Nps de cada tamaño por ml) en el hígado a 20 ml/s. El panel superior de la figura muestra tres imágenes del tejido hepático tras la inyección génica hepática con cierre vascular mediado por cirugía. La imagen central muestra un hepatocito con su núcleo en la parte superior izquierda y un vaso en la parte inferior derecha. Se amplían los recuadros A, B y C de la imagen central correspondientes al área cercana al compartimento nuclear. Sólo partículas de 4 nm de diámetro están presentes en esta zona y son referenciadas por las flechas negras. El recuadro D también es ampliado y corresponde a una zona de transición entre el hepatocito y el vaso. En esta zona se observan Nps de 15 nm que no entran en el hepatocito y siempre están dentro de vesículas. Barra completa para la imagen central: 2.000 nm. Barra completa para las imágenes detalle A, B y C: 200 nm. El panel inferior de la figura muestra el tejido hepático tras la inyección hidrodinámica de las partículas mediada por cateterismo abierto sin cierre vascular. En la imagen izquierda del panel inferior se observa el citoplasma de un hepatocito y parte del núcleo (parte superior). El recuadro A

Hidrofección hepática no viral

correspondiente a la envoltura nuclear se amplía y se muestra a la derecha. En el detalle se puede observar la presencia de Nps de 4 nm de diámetro (flechas blancas) en el interior del núcleo. El recuadro B correspondiente al citoplasma también se agranda (imagen derecha inferior). En esta zona se observan tanto Nps de entre 4 y 10 nm (nunca de 15 nm) de diámetro (flechas negras dobles) como las Nps de 4 nm (flechas negras individuales). Las partículas de 4 nm están ampliamente distribuidas en el citoplasma, mientras que las Nps más grandes parecen ser menos abundantes. Barra completa para la imagen de la izquierda: 2.000 nm. Barra completa para las imágenes detalle A y B: 500 nm.

En el panel superior se muestra un campo general de tejido hepático tras la inyección hidrodinámica de Nps por el procedimiento quirúrgico. En la imagen del centro del panel superior se ve un hepatocito en la parte izquierda. Se puede distinguir la envoltura nuclear y parte del interior del núcleo en la esquina superior izquierda. En la parte derecha de esta imagen central del panel superior se puede observar una célula de origen macrófago. Se observan Nps de 4 nm en el interior del citoplasma del hepatocito, distribuidas uniformemente. Sin embargo, no se encuentra ninguna de las partículas de 15 nm dentro de los hepatocitos. Las imágenes A, B y C (a la izquierda del panel superior) son ampliaciones de las áreas encuadradas en el citoplasma del hepatocito, cerca de la envoltura nuclear. En estas imágenes A, B y C se pueden observar las Nps de 4 nm, indicadas por una flecha negra. Encontramos varias Nps en esta zona pero ninguna de ellas llegaba a atravesar la envoltura nuclear. La figura D (en la parte derecha del panel superior) es la ampliación de la zona enmarcada en la parte derecha de la imagen central y se corresponde con una zona de transición entre el hepatocito y el vaso. Se puede observar una célula macrófaga y, en su interior,

varias Nps de 15 nm atrapadas en vesículas citoplasmáticas. Todas las Nps grandes que se ven se localizaban en entornos similares.

En el panel inferior se muestra el interior de un hepatocito tras la inyección de Nps de oro coloidal de 4 y 15 nm empleando el procedimiento de transferencia por cateterismo abierto. Este panel está compuesto de 3 imágenes. A la izquierda del panel hay una imagen que muestra un campo general del citoplasma de un hepatocito. Se puede observar en la parte superior de dicha figura el contorno del núcleo (envoltura nuclear) y parte del nucleosol. Las áreas encuadradas y nombradas como A y B en la imagen panorámica fueron ampliadas en las imágenes presentes a la derecha del panel. El área A corresponde con la zona de transición entre el citoplasma y el núcleo, separados por la envoltura nuclear. Aquí se puede observar cómo las Nps pequeñas de diámetro ≤ 4 nm (flechas blancas) son capaces de cruzar la envoltura y alcanzar el núcleo de la célula. El área B corresponde con una zona puramente citoplasmática donde es posible observar Nps tanto de 4 nm (flecha negra) como otras de mayor tamaño (siempre menores de 15 nm; doble flecha negra). Esto indica que la mayor presión mediada por la hidrofeción en un lóbulo del hígado facilita la entrada de las partículas en solución al interior de la célula y su núcleo. Sin embargo, el acceso de las nanopartículas de 15 nm o mayores a la célula parece estar dramáticamente limitado.

5 Transferencia génica (eGFP) a segmento hepático humano vascularmente estanco procedente de resección quirúrgica

5.1 Procedimiento de transferencia

Tras observar que el procedimiento de hidrofección en cerdo es eficiente para la entrega de un gen exógeno y observar que éste se traduce de forma eficaz en tejido, aunque se exporta con dificultad al torrente sanguíneo, consideramos la posibilidad de trasladar el procedimiento de transfección directamente a tejido hepático humano. Para ello se establece un modelo de segmento hepático humano estanco con el fin de realizar la hidrofección *ex vivo* del mismo.

Este modelo consiste en aprovechar la exéresis quirúrgica de un segmento hepático de un paciente afectado por un proceso tumoral. Tanto el segmento extraído como la sección de hígado que se conserva en el paciente han de ser minuciosamente aisladas vascularmente mediante grapas, ligaciones y cauterización. El cirujano marca la entrada de una vena suprahepática para ser utilizada en la transferencia génica. De este modo tenemos un segmento de hígado completamente estanco y con una única entrada para la transferencia, consiguiendo emular el modelo porcino de hígado cerrado quirúrgicamente.

Tras la recepción del segmento hepático, se ubica un introductor corto de 9 Fr en la vena suprahepática marcada (Fig. 28) y se confirma el área de perfusión mediante la inyección de solución de contraste y Rx (Fig. 29). La imagen de escopia permitirá identificar 3 zonas del segmento (Fig. 30) para la toma de muestras: A) zona de perfusión directa; B) zona de perfusión secundaria o intermedia;

C) zona con perfusión muy residual o sin perfusión, cuando sea posible, de lo contrario es similar a la zona B. Una vez confirmada la perfusión e identificadas las áreas, el introductor es fijado mediante sutura para evitar la pérdida de volumen inyectado y se realiza la transferencia génica bajo unas condiciones de volumen y flujo.

Al tratarse de un segmento hepático *ex vivo*, las muestras de tejido obtenidas han de permanecer viables durante un periodo de tiempo para permitir que el gen inyectado se exprese y por ello deberán ser mantenidas en medio de cultivo.

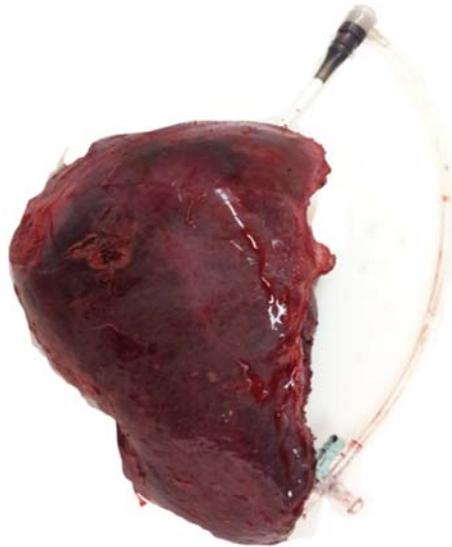


Figura 28. Posicionamiento del catéter en el segmento hepático humano. En la imagen se muestra un segmento hepático humano procedente de resección quirúrgica y totalmente estanco. Se inserta un introductor corto de 9 Fr en una vena suprahepática referenciada por el cirujano.

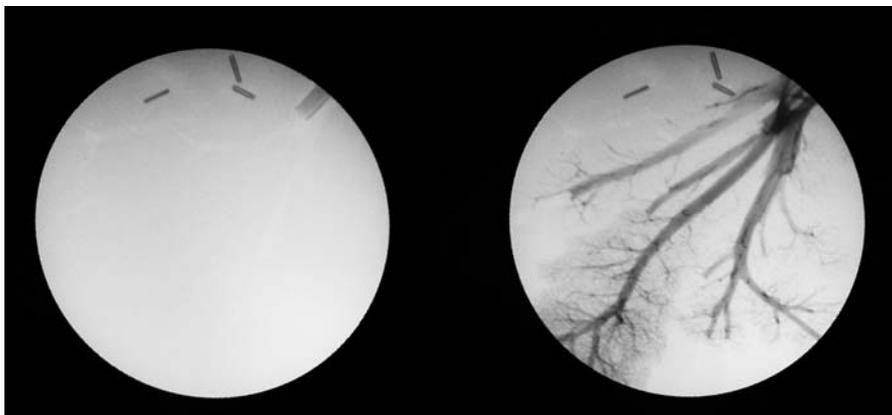


Figura 29. Área de perfusión en el segmento hepático humano mediante imágenes de Rx. En la imagen se muestran dos imágenes de Rx de un segmento hepático humano. En la primera se observa el posicionamiento del introductor de 9 Fr en la esquina superior derecha y 3 grapas en la parte central superior. En la segunda imagen se confirma el área de perfusión tras la inyección de solución yodada de contraste.

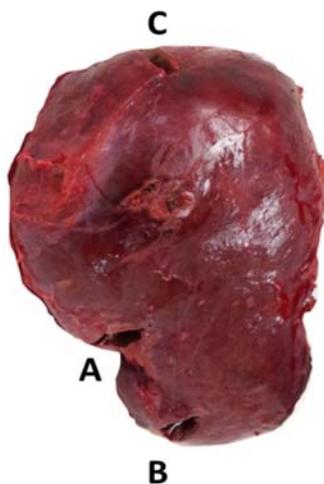


Figura 30. Toma de muestras tisulares en el segmento hepático humano. En la imagen se muestra un segmento hepático humano procedente de resección quirúrgica tras la toma de muestras representativas del tejido. Se toman piezas de aproximadamente 2x1 cm y 1 mm de grosor. La escopia permite identificar 3 áreas en el segmento según la incidencia de la inyección, en los segmentos cuyo tamaño permite diferenciar 3 zonas.

5.2 Condiciones óptimas de perfusión (flujo y sentido de inyección) para la transferencia del gen marcador eGFP

Como primer paso para la aplicación del procedimiento de hidrofección en tejido humano, se han de establecer las condiciones óptimas de transferencia. Para ello se utiliza el gen marcador que codifica eGFP. Se realizan perfusiones bajo diferentes condiciones de volumen (1/5 y 1/10 del peso del segmento) y flujo (1, 10 y 20 ml/s) y se analizan los índices de entrega y transcripción del gen y la relación entre ambos índices en 2 zonas del segmento en este caso (A: perfusión directa; B: perfusión secundaria o residual) para establecer las idóneas.

5.2.1 Entrega génica en tejido hepático

En la figura 31 se muestra el índice aparente de entrega del gen, expresado como número de copias del gen eGFP por célula normalizada. Se observa que el índice de entrega es directamente proporcional a la velocidad empleada en la perfusión. En las mismas condiciones de volumen, la velocidad de perfusión de 20 ml/s alcanza una entrega significativamente ($p < 0.01$) superior (más de 10 veces) a la alcanzada a 10 ml/s y a 1 ml/s. Además, cuando a 20 ml/s comparamos el efecto del volumen en la eficiencia de entrega del gen se observa cómo el empleo de un mayor volumen (1/5) media una entrega del gen significativamente superior ($p < 0.01$) a la alcanzada con un volumen equivalente a 1/10 del peso del segmento.

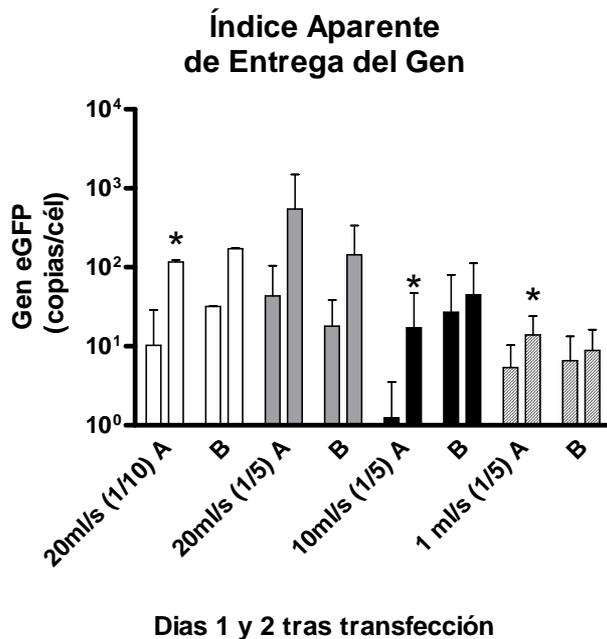


Figura 31. Índice de entrega aparente del gen. Los segmentos hepáticos humanos son transfectados con solución salina conteniendo el gen eGFP (20 µg/ml). Se establecen diferentes grupos según las condiciones de flujo (1, 10 y 20 ml/s) y del volumen total inyectado (1/5 o 1/10 del peso del segmento, en gramos). Las muestras se incuban 1 y 2 días y posteriormente se determina el índice de entrega del gen (en número de copias por célula) en las diferentes áreas del segmento (las muestras B y C se unen). Los diferentes grupos se comparan con el de mayor eficiencia de entrega (20 ml/s de velocidad de flujo y 1/5 del peso) y muestran significación estadística los grupos de 1 ml/s, 10 ml/s y 20 ml/s empleando el volumen de 1/10. *: $p < 0.01$ tras el análisis estadístico de Two-way ANOVA con la post-corrección de Bonferroni.

5.2.2 Transcripción del gen en tejido hepático

El índice de transcripción del gen eGFP también se determina y se representa en la figura 32, expresado como el número de copias de ARNm de eGFP por célula normalizada. La gráfica muestra cómo apenas existen diferencias entre las condiciones empleadas para la transferencia a excepción del grupo de 1 ml/s. Cuando la perfusión se realiza a 10 y 20 ml/s se llegan a alcanzar unos índices de transcripción de hasta 1000 copias por célula a las 48 horas de la transferencia. Solamente cuando la perfusión se realiza

a 1 ml/s el índice de transcripción alcanzado es significativamente menor ($p < 0.01$) al obtenido con 20 ml/s de flujo y un volumen de 1/5 del peso del segmento.

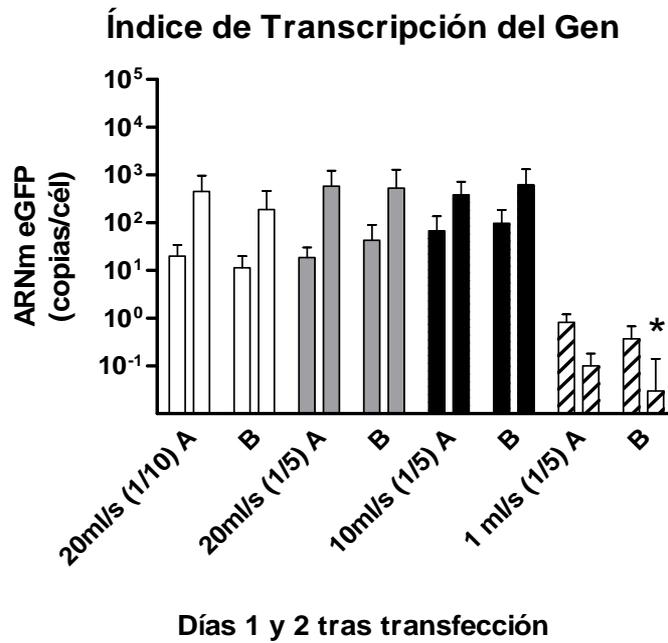


Figura 32. Índice de transcripción del gen. Los segmentos hepáticos humanos son transfectados con solución salina conteniendo el gen eGFP (20 $\mu\text{g/ml}$). Se establecen diferentes grupos según las condiciones de flujo (1, 10 y 20 ml/s) y del volumen total inyectado (1/5 o 1/10 del peso del segmento, en gramos). Las muestras se incuban 1 y 2 días y posteriormente se determina el índice de transcripción del gen (en número de copias de ARNm de eGFP por célula) en las diferentes áreas del segmento (las muestras B y C se unieron). Los diferentes grupos se comparan con el de mayor eficiencia de entrega (20 ml/s de velocidad de flujo y 1/5 del peso) y sólo muestra significación estadística el grupo de 1 ml/s. *: $p < 0.05$ tras el análisis estadístico de Two-way ANOVA con la post-corrección de Bonferroni.

5.2.3 Presencia de la proteína eGFP en tejido hepático

Para completar el proceso de decodificación genética, se determinó la presencia de la proteína eGFP en el tejido hepático mediante microscopía de fluorescencia e inmunohistoquímica.

Tras la transferencia génica se obtienen las muestras de tejido y se cultivan en condiciones óptimas durante 24 horas para permitir la expresión del gen. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se procesan para la visualización de la proteína. Para la microscopía de fluorescencia, las muestras se congelan y se realizan criosecciones para su visualización directa en el microscopio de fluorescencia. En el caso de la inmunohistoquímica, las muestras se embeben en parafina, se cortan y se procesan como se explica en material y métodos para identificar la presencia de la proteína utilizando unos anticuerpos específicos para eGFP. En la figura 33 se muestran unas imágenes representativas de las dos técnicas.

Las imágenes a-c (20x) muestran la microscopía de fluorescencia de secciones de hígados a los que se les había inyectado el gen eGFP a 20 ml/s en un volumen final equivalente a 1/10 del peso del segmento. Se puede observar la expresión de la proteína fluorescente con elevada intensidad en abundantes células. La imagen e corresponde a una inmunohistoquímica control en la que no se emplea anticuerpo primario. Las imágenes f-g muestran la inmunohistoquímica (40x) en secciones de hígados a los que se les ha transferido el gen a una velocidad de 10 ml/s y en un volumen final equivalente a 1/5 del peso del segmento. Se puede observar el marcaje positivo de la proteína en distintas áreas del tejido en

un tono marrón. Las imágenes d y h corresponden respectivamente a la microscopía de fluorescencia y a la inmunohistoquímica realizada en secciones de hígados a los que se les transfirió el gen a 1 ml/s. En estas últimas se puede observar cómo la proteína eGFP es apenas detectable empleando cualquiera de las dos técnicas.

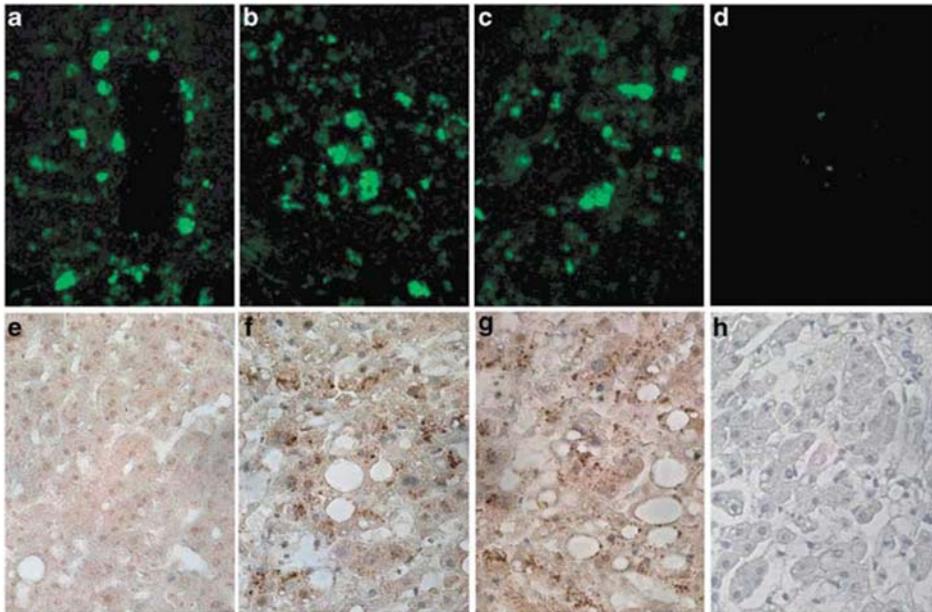


Figura 33. Fluorescencia e inmunohistoquímica de eGFP. Se muestran imágenes de fluorescencia e inmunohistoquímica de la proteína eGFP presentes en las secciones tisulares hepáticas. En las 3 primeras imágenes (a-c) el segmento hepático es transfectado con la solución génica a 20 ml/s y con un volumen final de 1/10 del peso del segmento. Las muestras del tejido se mantienen en cultivo durante 24 horas y se congelan. Las criosecciones se emplean para la microscopía de fluorescencia. Las imágenes muestran áreas representativas a una magnificación de 20x. Las imágenes e-g muestran secciones hepáticas procedentes de segmentos transfectados a 10 ml/s con un volumen fina de 1/5 del peso del segmento. Tras 24 horas de cultivo se lleva a cabo el procesado de las muestras para la inmunohistoquímica frente a eGFP en secciones de parafina procedentes de tejido fijado en formalina. La imagen e corresponde a un control de inmunohistoquímica llevado a cabo en ausencia del primer anticuerpo. Las imágenes f y g muestran la reacción específica frente a la proteína eGFP a 40 aumentos. El tejido se contrasta con hematoxilina. Las imágenes d y h muestran, respectivamente, la microscopía de fluorescencia y la inmunohistoquímica en secciones hepáticas del grupo de 1 ml/s.

5.2.4 Actividad intrínseca de transcripción del gen y elección de condiciones óptimas de eficiencia

Dada la existencia de algún factor limitante en el proceso de decodificación genética, observada en el modelo porcino causante de que la entrega de una mayor dosis de plásmido frenara o regulara la transcripción del gen, calculamos la relación existente entre el índice de transcripción y el de entrega también en tejido humano. Así se determina la actividad intrínseca de transcripción, que se representa en la figura 34 y se expresa como el número de copias de ARNm de eGFP por cada copia del gen *eGFP* en cada célula. Los resultados muestran que el grupo con el flujo de 10 ml/s y el volumen de 1/5 del peso del segmento alcanzaron una actividad significativamente superior ($p < 0.01$) a la de los otros grupos empleados, llegando a obtenerse una actividad de transcripción de hasta 10 copias por cada copia de plásmido entregada.

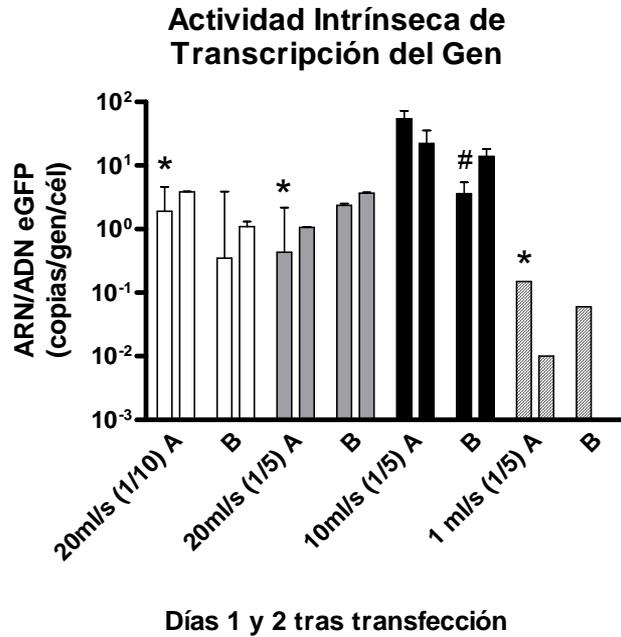


Figura 34. Actividad intrínseca de transcripción del gen. Los segmentos hepáticos se transfectan bajo diferentes condiciones de flujo (1, 10 y 20 ml/s) y volumen total de solución génica (1/5 y 1/10 del peso del segmento, en gramos). Las muestras se analizan tras 1 y 2 días de cultivo y se determinan los índices de entrega y transcripción. Estos índices se relacionan y se calcula la actividad de transcripción del gen como el número de copias de ARNm de eGFP presente por cada copia del gen y por célula. Todos los grupos se comparan con el que midió una mayor actividad de transcripción (10 ml/s y volumen en ml de 1/5 del peso del segmento). Se observa significación estadística (*: $p < 0.01$) en los grupos de 20 ml/s (volumen total 1/5 y 1/10) y en el de 1 ml/s. También se observa significación estadística (#: $p < 0.01$) al comparar las zonas A y B del grupo de 10 ml/s y volumen 1/5. El test estadístico empleado es el Two-way ANOVA con la post-corrección de Bonferroni.

6 Transferencia del gen humano hIL10, utilizando las condiciones óptimas establecidas en el experimento con el gen marcador eGFP

Una vez establecido el procedimiento de transferencia génica y confirmado el interés del modelo obteniendo expresiones marcadas de la proteína codificada por el gen transferido, se debe dar el salto y realizar este estudio con un gen de interés terapéutico. Para ello se utiliza el gen que codifica la hIL10, que es capaz de modular la respuesta inflamatoria, por su potencial interés en el trasplante y múltiples patologías de tipo inflamatorio.

6.1 Entrega génica en tejido hepático

El procedimiento de transferencia génica se realiza tal y como se ha explicado anteriormente. El volumen de solución génica empleado siempre es equivalente a 1/5 del peso del segmento y se utilizan las velocidades de flujo de 10 y 20 ml/s. Los índices de entrega alcanzados tras 24 y 72 horas de cultivo post-transfección se muestran en la figura 35, expresados como número de copias del gen por célula normalizada.

Se observa que la entrega en la zona de perfusión directa (A) es muy similar en las dos condiciones de velocidad pero sin embargo cuanto más nos alejamos del foco de la transferencia mayor es la eficiencia de entrega con 20 ml/s, quizá porque esta velocidad de perfusión permite la distensión de los vasos para llegar más lejos. Los valores alcanzados se acercan a las 1000 copias del gen por célula normalizada aunque hay que puntualizar que es una entrega

aparente puesto que no es posible discernir si todo el plásmido ha accedido al citoplasma del hepatocito.

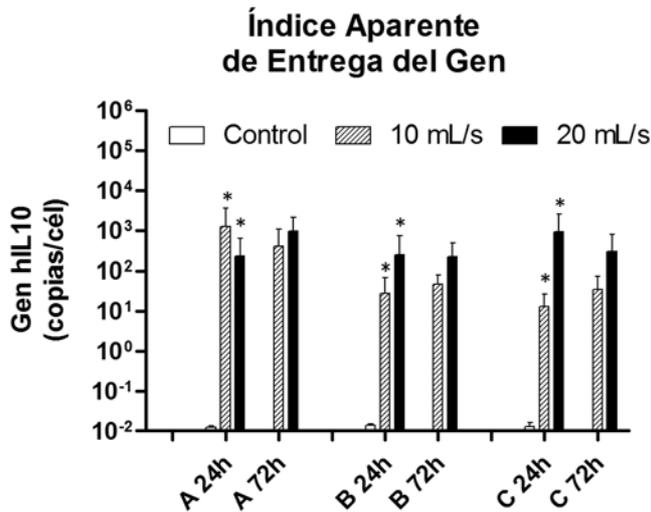


Figura 35. Índice de entrega aparente del gen *hIL10*. Los segmentos hepáticos humanos se transfectan con solución salina conteniendo el gen *hIL10* (20 µg/ml). Se establecen diferentes grupos según las condiciones de flujo (10 y 20 ml/s). Como control se utilizan muestras de tejido procedentes de segmentos hepáticos transfectados con el gen eGFP. Las muestras se incuban 1 y 3 días y posteriormente se determina el índice de entrega del gen (en número de copias por célula) en las diferentes áreas del segmento (A, B y C). Los diferentes grupos se comparan con el control y muestran significación estadística los grupos de 10 ml/s y 20 ml/s a 24 horas. *: $p < 0.05$ tras el análisis estadístico de Mann-Whitney.

6.2 Transcripción del gen en tejido hepático

Se determina el índice de transcripción tras 24 y 72 de cultivo post-transfección. El resultado se muestra en la figura 36 y se expresa como número de copias de ARNm de hIL-10 por célula normalizada. El índice de transcripción resulta mucho más heterogéneo que el de entrega. Se observa cómo la velocidad de perfusión de 20 ml/s alcanza una mayor eficiencia de transcripción del gen. Esta mejora con respecto a 10 ml/s es más marcada cuando la muestra se aleja del foco directo de perfusión. El índice

de transcripción se encuentra alrededor de 100 copias por célula, muy similar al obtenido con el gen eGFP, y se mantiene durante al menos 3 días tras la transferencia. Es importante remarcar el bajo nivel basal de transcripción de este gen en el control y eso se debe a que IL-10 es una proteína que no se expresa constitutivamente en los hepatocitos.

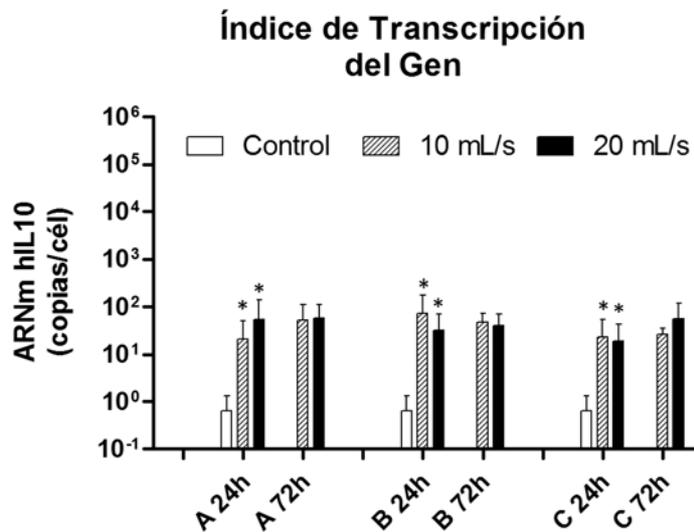


Figura 36. Índice de transcripción del gen *hIL10*. Los segmentos hepáticos humanos se transfectan con solución salina conteniendo el gen *hIL10* (20 µg/ml). Se establecen diferentes grupos según las condiciones de flujo (10 y 20 ml/s). Como control se utilizan muestras de tejido procedentes de segmentos hepáticos transfectados con el gen eGFP. Las muestras se incuban 1 y 3 días y posteriormente se determina el índice de transcripción del gen (en número de copias de ARNm de *hIL10* por célula) en las diferentes áreas del segmento (A, B y C). Los diferentes grupos se comparan a 24 horas con el control y muestra significación estadística solamente el grupo de 20 ml/s. *: $p < 0.05$ tras el análisis estadístico de Mann-Whitney.

6.3 Presencia de la proteína hIL10 en tejido hepático

Con el fin de determinar el índice de traducción de la proteína hIL10 en el tejido, realizamos un ELISA específico para la cuantificación de dicha proteína a partir de un homogenizado de tejido. Los resultados se muestran en la figura 37. El índice de traducción en las diferentes áreas del segmento hepático y en los tiempos de 0, 24 y 72 horas se expresa como número de copias de la proteína por célula normalizada. Para la determinación de la proteína empleamos un kit de ELISA específico que ofrece una alta fiabilidad (coeficiente de correlación de la curva patrón >0.99) y una sensibilidad muy elevada (curva patrón de 0 a 125 pg/ml). En la gráfica se puede observar que en los segmentos hepáticos control la expresión de la proteína IL10 en tejido hepático es indetectable. Sin embargo, trascurridas 24 y 72 horas de la hidrofección, la proteína IL10 se traduce hasta unos niveles de entre 100 y 1,000 copias por célula. Además, los resultados muestran que la velocidad de 10 ml/s media una traducción ligeramente inferior a la que ofrece la velocidad de 20 ml/s en todas las zonas del segmento hepático.

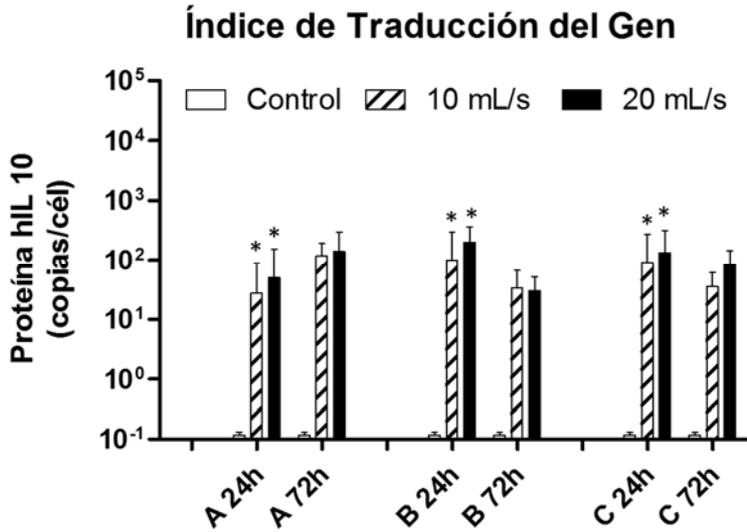


Figura 37. Índice de traducción del gen *hIL10*. Los segmentos hepáticos humanos se transfectan con solución salina conteniendo el gen *hIL10* (20 µg/ml). Se establecen diferentes grupos según las condiciones de flujo (10 y 20 ml/s). Como control se utilizan muestras de tejido procedentes de segmentos hepáticos transfectados con el gen eGFP. Las muestras se incuban 1 y 3 días y posteriormente se determina el índice de traducción del gen (en número de copias de la proteína hIL10 por célula) en las diferentes áreas del segmento (A, B y C). Los diferentes grupos se comparan con el control y muestran significación estadística los grupos de 10 ml/s y 20 ml/s a 24 horas. *: $p < 0.05$ tras el análisis estadístico de Mann-Whitney.

Hidrofección hepática no viral

DISCUSIÓN

Hidrofección hepática no viral

La presente tesis doctoral tiene como objetivo estudiar en detalle el proceso de transferencia génica hidrodinámica (o hidrofeción) hepática para determinar el potencial interés de esta estrategia terapéutica para su uso en la clínica. Además, pretende desarrollar diferentes procedimientos de hidrofeción hepática que resulten seguros y eficaces para expresar el gen exógeno transferido. Para ello, la eficiencia de transferencia génica y las diferentes fases del proceso de decodificación del gen entregado han sido evaluadas detalladamente en diferentes modelos preclínicos. El estudio del proceso de decodificación génica se ha llevado a cabo a partir de la cuantificación del ADN entregado, el ARN transcrito y la proteína traducida y ha sido expresado utilizando parámetros intuitivos y/o fácilmente comprensibles como es el número de copias de estas especies moleculares por célula. Este tipo de determinación cuantitativa tras la transferencia de un gen no había sido realizado con anterioridad por ningún otro grupo investigador, al menos de forma sistemática. La expresión cuantitativa de los datos nos permitió entender mejor cómo un gen exógeno es expresado por el tejido diana tras la transferencia génica y comparar de una manera más fiable los diferentes procedimientos para la entrega del gen entre sí y respecto a los controles. Estudios anteriores habían documentado que la expresión en sangre de proteínas plasmáticas tras la transferencia de los genes que las codifican era ineficiente en modelos de animales grandes pero no se había elucidado la causa de tal ineficiencia [41]. Dado el potencial interés clínico de la terapia génica no viral como estrategia terapéutica de futuro, con un amplio margen de uso, decidimos realizar el estudio

molecular sistemático para evaluar su eficiencia y encontrar las barreras o pasos limitantes existentes. Con este fin, utilizamos dos modelos de hidrofección preclínicos: modelo *in vivo* en cerdos (con diferentes estrategias y condiciones de entrega del gen) y modelo *ex vivo* de segmento hepático humano, como pasos previos que pudieran justificar la traslación del procedimiento de hidrofección a la clínica.

La terapia génica ha demostrado ser una estrategia terapéutica con un gran interés traslacional, ya que una vez alcanzada una estrategia con un grado de seguridad elevado y con capacidad para expresar con eficacia el gen de interés, su aplicación en la clínica no tendría límites. Una vez conocida la etiopatogenia molecular de una enfermedad, se podría diseñar un tratamiento para casi cualquier enfermedad.

La transferencia génica hidrodinámica ya ha demostrado, en modelo murino, que es un método eficiente para la transferencia y expresión de un gen heterólogo. De hecho, nuestro grupo consiguió por primera vez (2003) la expresión plasmática de la proteína humana de la alfa-1-antitripsina en niveles terapéuticos y durante periodos superiores a los 6 meses en ratones [27], tras la transferencia hidrodinámica del gen *hAAT* controlado por su promotor natural. La entrega del gen se verificaba por la inversión en el flujo sanguíneo intrahepático tras la inyección de la solución salina conteniendo el gen. La solución génica inyectada es capaz de superar el lecho vascular, favorecido por una presión pulsátil en sentido anterógrado que contribuye a la entrada del gen al interior

del hepatocito hasta que se recuperaba el sentido de la circulación sistémica.

Tras haberse confirmado que la hidrofeción era capaz de mediar la expresión en niveles terapéuticos de una proteína heteróloga, el siguiente reto fue trasladar la técnica a modelos animales con mayor similitud anatómica y fisiológica con el ser humano. Se debían modificar los parámetros de la perfusión para que el procedimiento fuera viable, puesto que las condiciones impuestas por el modelo hidrodinámico murino (doblar la volemia del animal en escasos segundos) serían inviables en animales de mayor tamaño. La manera de conseguir un aumento de la presión intrahepática sin perjuicios hemodinámicos sistémicos consistía en realizar la perfusión regional, directamente sobre el hígado [35, 36, 38, 41], de modo que además se podía reducir el volumen de solución génica requerido. Para alcanzar una presurización elevada en el hígado, además de utilizar volúmenes de solución génica y velocidades de flujo más exigentes, se propusieron y desarrollaron diferentes estrategias con las que dirigir la perfusión a un área concreta del órgano y limitar parcialmente la vascularización hepática [37, 39, 40]. Sin embargo, a pesar de todos los intentos realizados por diferentes grupos en todo el mundo, variando las condiciones de perfusión y el procedimiento, en ningún caso se han alcanzado niveles plasmáticos de una proteína que se acercara siquiera a su valor terapéutico tras realizar una hidrofeción hepática en animales grandes.

Dado que no se sabía el motivo por el cual un procedimiento tan eficaz en modelo murino resultaba ineficiente en modelos de

mayor tamaño, nos planteamos evaluar el potencial interés traslacional del procedimiento mediante un estudio molecular detallado del proceso de decodificación génica, algo que no se había realizado. Nos enfrentamos a un nuevo reto al realizar unas determinaciones cuantitativas que no habían sido utilizadas con anterioridad. Esta manera de expresar los resultados implicaba obtener datos exactos de número de copias de nuestro gen, el transcrito y la proteína en la muestra. Para ello debíamos preparar curvas patrón para el gen concreto utilizando el propio plásmido y establecer las condiciones de PCR y ELISA óptimas para alcanzar la linealidad y que los datos interpolados fueran fiables. Después, transformar los datos en parámetros fácilmente comprensibles como son los índices de entrega, transcripción y traducción por célula, en base a los pesos moleculares de los genes y la proteína y los valores de contenido en ADN, ARN y proteína total por célula normalizada.

Modelos de hidrofección hepática *in vivo* en cerdo

Los modelos propuestos con anterioridad sugerían que el cierre vascular hepático potenciaba la eficiencia del procedimiento, pero en ningún caso el cierre había sido completo. Así pues, basados en trabajos de cirugía que apuntaban que la circulación hepática en cerdo podía estar interrumpida durante cierto periodo de tiempo sin perjuicios para el animal [70, 71], desarrollamos un procedimiento quirúrgico en el que la transferencia génica se llevaba a cabo *in vivo* con el órgano vascularmente excluido por completo [69]. Este procedimiento era el único que permitía

asegurar un cierre vascular total del hígado. Además ofrecía la posibilidad de controlar el punto exacto de la inyección y observar la reacción del órgano al incremento de volumen y presión ejercido por la solución génica inyectada.

- Procedimiento quirúrgico

Este procedimiento consistía en la realización de una laparotomía en el animal, el cierre secuencial de los vasos de éste, primero los que aportan sangre al órgano y por último la vena cava inferior suprahepática que lleva la sangre del hígado hacia el corazón, evitando así la sobrecarga del hígado. En cada caso se dejaba libre acceso a la perfusión retrógrada o anterógrada correspondiente (vena cava infrahepática y/o vena porta). Como este modelo permitía controlar todos los parámetros de la perfusión, se realizaron unos experimentos exploratorios empleando el gen de la eGFP (que permitiría una rápida y sencilla visualización de la expresión de la proteína por microscopía de fluorescencia) con la intención de elucidar las mejores condiciones de perfusión. Así pues, se evaluaron la eficiencia y los efectos adversos de la transferencia sobre el animal bajo diferentes condiciones de volumen de solución génica (200, 400 y 600 ml), velocidad de perfusión (10, 20, 40 y 60 ml/s) y sentido de la inyección (anterógrada y/o retrógrada).

Los trabajos realizados por otros grupos sugerían que para mejorar la eficiencia del procedimiento se requerían unas condiciones de perfusión muy exigentes (en volumen y flujo de inyección) para vencer la elasticidad del hígado y así ejercer la suficiente presión

como para facilitar la entrada del gen en los hepatocitos [35, 84]. Sin embargo, los experimentos que nosotros realizamos en este sentido con volúmenes de 400 y 600 ml (lo que equivale a una relación en mililitro/gramo igual o mayor a 1:1 con respecto al peso del hígado de los cerdos empleados), velocidades de 40 y 60 ml/s e inyección simultánea por venas cava y porta arrojaron unos resultados que no sólo no mejoraban los de condiciones más suaves, sino que las empeoraba. Además, durante las inyecciones se podía observar cómo el hígado se hinchaba hasta un nivel de extensión al límite de la rotura, resultando un riesgo para la salud del animal. Esto se confirmó tras el análisis de la presencia de transaminasas en sangre periférica, que resultaba mucho mayor al alcanzado tras el empleo de condiciones más suaves. En nuestras manos, el procedimiento de transferencia empleando las condiciones más suaves de perfusión resultó seguro y no se observaron daños en el tejido, como otros grupos habían documentado [85, 86]. Además, contrariamente a lo descrito con anterioridad [87], los parámetros hemodinámicos se recuperaban inmediatamente tras la revascularización sin causar ninguna alteración en la función cardíaca.

Tras desestimar estas condiciones, nos centramos en utilizar las condiciones de hidrofección más suaves. Así, establecimos el volumen fijo de 200 ml de solución génica y valoramos el efecto de la velocidad de perfusión y el sentido de la inyección. Cuando se realiza la intervención bajo las condiciones suaves de perfusión, los niveles de transaminasas crecen ligeramente pero rápidamente vuelven a la normalidad. Evaluamos las distintas fases del proceso

de decodificación genética del gen transferido mediante PCR cuantitativa y ELISA.

Los resultados de hidrofección utilizando el gen marcador eGFP mostraron que la velocidad de 10 ml/s mediaba una mayor entrega del gen tanto en la inyección retrógrada como la anterógrada, siendo ligeramente mayor por vía retrógrada a 10 ml/s y al revés con 20 ml/s. En el mejor de los casos, se consiguió entregar cerca de una copia del gen por célula normalizada. Suponiendo que este valor fuera homogéneo para todas las células, debía ser suficiente para expresar la proteína, ya que cada célula normal cuenta con 2 copias de un gen, para producir los niveles normales de cada proteína. La distribución de la entrega génica es difícil de determinar y podría también ser interpretada como la entrega de varios cientos de copias del gen en un reducido número de células. Cuando analizamos la transcripción del ARN en el tejido hepático, observamos la inversión de la tendencia observada en la entrega. Por vía retrógrada a 20 ml/s se obtiene el mayor índice de transcripción del gen mientras que por vía anterógrada los índices alcanzados son menores y son muy similares a 10 y 20 ml/s. Esto sugiere que el gen entregado por vía retrógrada presenta una mayor biodisponibilidad para ser transcrito.

La expresión de la proteína en tejido se evaluó mediante microscopía de fluorescencia aunque no fue posible encontrar ninguna señal positiva de fluorescencia de la proteína eGFP. Cuando se intentó determinar la proteína por western blot nos encontramos con el mismo resultado, fue imposible encontrar señal positiva de expresión de la proteína. Por ello, y para

asegurarnos la cuantificación de la proteína, utilizamos un kit ELISA de alta sensibilidad que permitía determinar niveles de eGFP de pg/ml. De este modo sí pudimos cuantificar el número de copias de la proteína por célula normalizada en el tejido. El índice de traducción fue ligeramente superior con la perfusión del gen a 10 ml/s hasta alcanzar un máximo de poco más de 100 moléculas de eGFP por célula. Éste es un valor muy bajo de producción proteica. La misma construcción génica, empleada en un modelo de transferencia génica cardíaca por nuestro laboratorio [88], demostró que puede ser expresada en tejido de cerdo en menos de 24 horas a niveles detectables por técnicas como la inmunohistoquímica. Esto sugiere que, de algún modo, una situación de estrés celular mediado por el procedimiento de hidrofección en hígado de cerdo puede estar bloqueando la expresión del gen durante un tiempo, como ha sido sugerido en diferentes trabajos [89-92].

Para determinar cuáles eran las condiciones que mejor rendimiento alcanzaban, calculamos la actividad intrínseca de transcripción del gen, que mediría la biodisponibilidad del gen entregado. Consideramos que, una vez salvado el bloqueo de la traducción de la proteína, el procedimiento óptimo de transferencia debe ser aquel que media el mayor ratio al relacionar el índice de transcripción con el de la entrega. En este caso, los resultados indicaron que el sentido retrógrado de la perfusión mediaba una mayor actividad intrínseca de transcripción, especialmente cuando se utilizaba una velocidad de 20 ml/s, resultando entre 10 y 100 veces superior a la alcanzada por vía anterógrada.

Posteriormente, se evaluó el potencial interés del procedimiento utilizando el gen terapéutico *hAAT* bajo las condiciones que mediaron la mayor actividad intrínseca de transcripción. Se pretendió dilucidar también, si el bloqueo en la traducción de un gen exógeno se supera con el paso del tiempo, analizando muestras periódicas (durante 14 días) de sangre y las muestras de tejido 14 días tras la intervención.

Se calcularon los índices de entrega, transcripción y traducción por célula normalizada al igual que se había hecho con el gen *eGFP*. Hay que destacar que en la construcción génica que contiene el gen *hAAT*, la expresión de éste está controlada por su promotor natural. Las condiciones óptimas de perfusión alcanzadas con el gen *eGFP* incluían la velocidad de perfusión a 20 ml/s. Sin embargo, dado que el plásmido *hAAT* contiene el gen completo con intrones y exones y su tamaño es casi 3 veces el del gen *eGFP*, empleamos además la velocidad de 40 ml/s (datos no mostrados) y comparamos los índices de entrega y transcripción por si se favorecía con ello la entrada de este constructo. La respuesta a esta pregunta es que no. El índice de entrega fue prácticamente idéntico con las dos velocidades de inyección y se encontró en ambos casos entre 1 y 0,1 copias del gen por cada 100 células. Este valor supone una disminución de entre 10 y 100 veces el alcanzado con el gen *eGFP*, pero hay que tener en consideración que esta determinación se realiza 14 días tras la intervención con lo que el proceso de hidrólisis ha podido ser completado y por tanto eliminado cualquier ADN presente en el espacio intersticial. Este lapso de tiempo permite a las enzimas

eliminar cualquier secuencia genética heteróloga que no haya sido realmente incorporada a la célula.

En el índice de transcripción del gen *hAAT* la velocidad de perfusión de 40 ml/s (datos no mostrados) no mejoró el nivel alcanzado con la velocidad de 20 ml/s y además provocó que la transcripción fuera menos homogénea a lo largo del órgano, indicando que el ADN entregado presenta una menor disponibilidad para ser transcrito. El valor promedio alcanzado con 20 ml/s es mayor y se acerca a la cifra de 1 copia por célula normalizada. Este índice quedó aproximadamente 10 veces por debajo del obtenido con el gen *eGFP* y esto creemos que puede ser debido bien al tiempo transcurrido desde la intervención o bien a que el funcionamiento del promotor natural es menos intenso que el de CMV, que dirige la expresión del gen *eGFP*. Del CMV se conoce su potente y rápida respuesta de activación para transcribir los genes que controla.

Dado que la velocidad de 40 ml/s no aportaba ninguna mejora en el rendimiento del procedimiento, el resto de experimentos se llevaron a cabo sólo con la velocidad que ofrecía el mejor balance beneficio/riesgo. Se cuantificó la presencia de la proteína humana de la alfa-1-antitripsina en sangre periférica en muestras obtenidas periódicamente durante el tiempo entre la intervención y el sacrificio del animal. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína, o bien se traducía muy ineficientemente o bien tenía serias limitaciones para alcanzar el torrente sanguíneo por algún motivo. Así, se observó un ligero incremento de su presencia durante los días 1 y 2 (20 ng/ml) que bajó en el día 5, hasta los 10

ng/ml. A partir de este momento, la presencia de la proteína aumenta paulatinamente hasta el día 10 (40 ng/ml) y sufre una caída en el día 14. En el momento de máxima expresión (día 10) los niveles de proteína quedaron más de 4 órdenes de magnitud por debajo de los considerados terapéuticos.

Para determinar si la proteína realmente era traducida pero no se secretaba al exterior de la célula, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de la proteína en tejido mediante ELISA. Los resultados obtenidos mostraron una elevada eficiencia de traducción, llegando a alcanzar hasta casi 10^6 copias por célula de la proteína hAAT. Este valor supone un incremento de 4 órdenes de magnitud con respecto al índice de traducción obtenido con el gen *eGFP*.

Una vez conocidos los valores absolutos de las diferentes especies moleculares involucradas en el proceso de decodificación genética, debíamos conocer su significado comparándolo con los estándares disponibles. Como patrones de referencia, empleamos muestras de hígado de ratón transfectado bajo las condiciones óptimas, que median concentraciones terapéuticas de la proteína hAAT en plasma, y muestras de hígados humanos con producción normal de hAAT. Comparamos el número de copias promedios de ADN, ARN y proteína en tejido y sangre para observar la dinámica del proceso de decodificación de cada especie y así tratar de definir el paso limitante en el cerdo. Esta comparación nos permitió observar que el comportamiento en ratón y en humano para la decodificación del gen hAAT es prácticamente idéntico. Además, se pudo ver que en el cerdo la decodificación del gen en el tejido

sigue un comportamiento similar, llegando a alcanzar un índice de traducción ligeramente superior al obtenido en ratón. Este valor de traducción proteica en tejido haría pensar que la concentración de la misma proteína en sangre debía ser también similar. Sin embargo, los niveles de la proteína en sangre mostraron un dramático descenso (aproximadamente 4 órdenes de magnitud) en cerdo con respecto a los dos modelos de referencia.

Estos resultados sugieren que la principal limitación en la eficiencia del procedimiento aparece en la fase de exportación de la proteína. Dicha limitación puede deberse bien a un defecto en el proceso de maduración, que en el caso de la hAAT requiere una glicosilación; a alguna diferencia en la secuencia de señalización de la proteína humana [93] y la del ratón [94] con respecto a la del cerdo [95] que, aunque mínima, ha sido observada y que puede impedir que ésta sea reconocida para su exportación.

Pensamos que este problema debe desaparecer, cuando la transfección se lleve a cabo en tejido hepático humano. Si el procedimiento es capaz de entregar el gen con biodisponibilidad para que éste se transcriba y traduzca no habrá problemas en su exportación puesto que las células del huésped reconocerán la proteína como propia por disponer de todos los elementos para la expresión normal de la proteína natural.

- Procedimiento de hidrofección mediado por cateterismo endovascular

Una vez establecido el procedimiento y considerando el potencial interés terapéutico de la hidrofección hepática, pretendimos establecer unas estrategias de entrega génica que resultaran igual de eficientes que la cirugía pero menos cruentas para el paciente. En este sentido, se plantearon dos procedimientos mínimamente invasivos, utilizando cateterismo endovascular.

El modelo abierto es un procedimiento que consiste en la implantación de un catéter con balón en una rama de la vena cava inferior suprahepática para realizar la perfusión de la solución génica en sentido retrógrado, sin bloquear ningún otro vaso hepático. Es el procedimiento más sencillo, rápido e inocuo para el animal. No se observa ninguna alteración en los parámetros hemodinámicos durante la intervención ni después de ella.

El modelo cerrado trata de emular el modelo quirúrgico al bloquear parte de la vascularización del hígado. Consiste en la implantación de dos catéteres con balón en la vena cava supra e infrahepática respectivamente, limitando la entrada al hígado. Paralelamente, se introduce por vía transhepática otro catéter con balón en la vena porta. Cuando los balones de los tres catéteres se llenan con aire, el hígado queda vascularmente estanco, a excepción de la arteria hepática. En ese momento se realiza la perfusión de la solución génica también en sentido retrovenoso. Las condiciones de hidrofección en los dos casos fueron las seleccionadas como óptimas en el modelo de cirugía.

Para evaluar la seguridad de ambos procedimientos y determinar algún posible daño hepático se determinaron los niveles de transaminasas en sangre durante los días posteriores a la intervención. Los resultados mostraron que el modelo abierto apenas modifica los niveles de transaminasas mientras que el modelo cerrado sí induce un incremento de estas enzimas pero sin llegar a ser significativamente superiores a las del modelo abierto ni clínicamente relevantes. Si a esto se añade que se ha demostrado que el procedimiento de transferencia génica hidrodinámica (hidrofección) no causa alteraciones significativas en la expresión de otros genes en ratón [96, 97], ni en modelos animales más grandes como el perro [98], se presenta una estrategia terapéutica de aplicación muy segura.

Del mismo modo que en el modelo de cirugía, se determinaron los índices de entrega, transcripción y traducción del gen hAAT y la concentración de la proteína en sangre. Los resultados de ambos modelos fueron comparados.

El índice de entrega génica alcanzado con el procedimiento de cateterismo cerrado fue significativamente superior (3 órdenes de magnitud) al obtenido con el procedimiento abierto, sugiriendo que el cierre vascular del órgano es indispensable para entregar eficientemente el gen. La entrega del ADN en el modelo cerrado fue aproximadamente 100 veces superior a la obtenida por cirugía, mientras que el abierto medió la menor entrega de todos. Esto se tradujo en unos niveles de proteína en tejido ligeramente superiores con el modelo cerrado. Sin embargo, los niveles de proteína plasmática de ambos procedimientos fueron

dramáticamente bajos, confirmando lo observado en el modelo quirúrgico y lo apuntado por otros autores que indicaban que apenas eran capaces de detectar la proteína. Los valores máximos obtenidos con el cateterismo cerrado fueron más de 10.000 veces inferiores a los terapéuticos mientras que los del cateterismo abierto fueron inferiores al nivel de detección del ELISA en la mayor parte de las muestras tomadas.

El ARN también fue cuantificado para evaluar si la entrega del gen bajo estas condiciones resultaba biodisponible al igual que en la cirugía. Del mismo modo que en la entrega, el índice de transcripción del procedimiento cerrado (10 copias por célula) resultó significativamente superior al del modelo abierto, también cerca de 3 órdenes de magnitud y entre 10 y 100 veces superior al del modelo quirúrgico. En ambos casos se observa una biodisponibilidad similar (10 copias de ARN por copia de ADN), aunque resulta ligeramente superior en el modelo abierto.

La proteína fue determinada por tres técnicas diferentes. La inmunohistoquímica (cualitativa) permitió observar la proteína en tejido y su distribución. En nuestras manos la presencia de la proteína en el tejido procedente de cerdo sólo se pudo encontrar en muestras del modelo cerrado y en aproximadamente el 1-3 % de los hepatocitos, mientras que el resto de células aparecían no marcadas. Otros autores han observado una distribución similar aunque ligeramente superior [41]. En las muestras de ratón, el número de células marcadas no es muy superior pero su tinción sí es más intensa. Esta observación sugiere que es posible que la entrega no sea homogénea y que quizá un gran número de copias

del gen entran en unas pocas células. En el tejido humano se observa un marcaje positivo suave en la mayoría de las células con un pequeño porcentaje con una tinción muy marcada. Estos resultados indican que la expresión nativa de la proteína en humanos está centrada en una población celular generalmente localizada en el área periportal. Sin embargo, en ratón y cerdo observamos que la expresión de la proteína ocurre también en células específicas pero preferentemente localizadas en el área perivenosa, vecinas a la vía de entrada del gen.

El resultado del western blot (semicuantitativo) mostró que la expresión de la proteína ocurre tanto con el modelo abierto como con el cerrado, resultando superior en este último en todos los casos testados. Pensamos que los niveles de proteína presentes en las muestras tras la hidrofección por el modelo abierto debieron quedar justo por debajo del límite de sensibilidad de la inmunohistoquímica.

Para confirmar estas observaciones semicuantitativas, se llevó a cabo un ELISA, que permitió expresar el valor como número de moléculas de proteína por célula. Los resultados confirmaron lo observado con las otras técnicas: que el procedimiento cerrado media una mayor eficiencia en la traducción de la proteína. Sin embargo, la diferencia entre los dos modelos en esta fase fue menor a la observada con la entrega y la transcripción, menos de 1 orden de magnitud. En comparación con la traducción mediada por el procedimiento quirúrgico, éste alcanza un índice 10 veces superior al del cateterismo cerrado. El hecho de que una mayor entrega y transcripción medie un menor índice de traducción

sugiere que o bien la etapa de traducción está actuando de compensación en el proceso para conseguir una expresión adecuada de la misma o bien que una entrega excesiva de gen, especialmente si ocurre sobre un reducido número de células como se observa en la inmunohistoquímica, esté bloqueando o saturando el proceso de decodificación.

- Comparación del proceso de decodificación del gen hAAT en el modelo porcino con respecto a los “patrones oro” de referencia

Los promedios de todos estos índices se compararon con el modelo de cirugía y con los *gold standard* o patrones de referencia. Los resultados mostraron que sea cual sea el modelo de hidrofección empleado en el cerdo la proteína no alcanza la circulación sistémica, indicando un problema interespecie de maduración y/o exportación puesto que la proteína sí está presente en el tejido. Se pudo observar también que el comportamiento del cateterismo abierto es muy similar al presente en el modelo quirúrgico, y ambos se asemejan bastante al proceso lineal de los patrones oro, en cuanto a los estudios en tejido. Además, se determinó que el índice de entrega no ha de ser tan elevado como se pensaba para conseguir una traducción eficiente, como se puede observar en ratón, que era capaz de alcanzar niveles terapéuticos de la proteína con 1 copia del gen por cada 100 células normalizadas. El modelo quirúrgico alcanza un nivel de la proteína en tejido igual o superior al del ratón, sugiriendo que, si

se desbloqueara su fallo en la exportación, podríamos estar muy cerca de conseguir niveles terapéuticos en sangre.

Nos llamó la atención el comportamiento en el proceso de decodificación del cateterismo cerrado. Esperábamos que con una entrega tan eficiente conseguiríamos unos niveles de proteína mayores al resto de los modelos. Sin embargo, cada paso del proceso se veía más ineficiente. Esto nos hizo pensar que, de algún modo, el índice de entrega se ha de mover en unos niveles adecuados para que el sistema funcione con eficiencia y que un exceso de entrega puede reducir su eficiencia. Con el fin de comprobar esta hipótesis, llevamos a cabo un estudio dosis-respuesta del plásmido hAAT en el modelo de ratón que sabíamos que se comportaba de manera lineal, similar al estudio farmacodinámico llevado a cabo en nuestro laboratorio tiempo atrás [99].

Los resultados de dicho estudio mostraron que la linealidad en el número de copias (ADN, ARN, Proteína) durante el proceso de decodificación se mantiene solamente cuando las condiciones de entrega son óptimas. Así pues, observamos que, como era previsible, el aumento en la concentración del plásmido durante la inyección hidrodinámica se traduce en un índice de entrega mucho más elevado, aumentando en casi 6 órdenes de magnitud al aumentar la concentración desde 5 a 320 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, este aumento en el índice de entrega del gen no siempre supone una mayor tasa de transcripción y/o de traducción del mismo. Ocurre más bien al contrario y así, cuando la entrega supera un cierto umbral (cercano a 1 copia cada 100 células) la eficiencia en el

proceso de decodificación del gen disminuye. Se ha demostrado que la concentración que media una mayor eficiencia en el proceso es la de 20 $\mu\text{g/ml}$, ya que consigue que el proceso sea completamente lineal con una producción de la proteína en niveles terapéuticos o supraterapéuticos. A partir de esa concentración, el incremento de la concentración consigue una mayor entrega del gen, que media un incremento (proporcionalmente menor) de la transcripción, pero un índice de traducción similar o incluso ligeramente inferior. En el modelo porcino hemos observado ese mismo comportamiento y así, cuando empleamos el modelo de cateterismo cerrado se obtiene un índice de entrega muy elevado (superior al ratón) pero, sin embargo, la eficiencia de la transcripción desciende. Aunque la traducción es superior al modelo abierto, esto lo consigue a expensas de entregar casi una copia por célula, lo que podría resultar tóxico si tenemos en cuenta que este es un valor promedio por célula normalizada. Podría darse la circunstancia de que una misma célula tuviera varias decenas del gen entregado, mientras que muchas otras no tuvieran ninguna copia. Se observó también que el procedimiento que medió menor tasa de entrega del gen, fue precisamente el de mayor índice de traducción. Todo esto sugiere que no se necesita una entrega muy elevada del gen sino una cantidad óptima (en torno a 1 copia cada 100 células) que presente una elevada biodisponibilidad. Eso debe depender de las condiciones de la transferencia, que interferirá en la localización intracelular final del gen entregado y en la integridad funcional del tejido diana.

- Estudio ultraestructural de la distribución de nanopartículas de oro

Los procedimientos de cateterismo abierto y cirugía alcanzaron un índice de entrega muy similar, siendo el cateterismo ligeramente inferior. Sin embargo, el modelo quirúrgico medió una traducción de la proteína en tejido casi 100 veces superior.

La hidrofección es un procedimiento físico de transferencia génica y por esta razón inyectamos partículas de diferente tamaño para evaluar, mediante un estudio de microscopía electrónica de transmisión, las condiciones limitantes de las barreras biológicas. Las partículas de gran tamaño se encontraron en las células con actividad fagocítica principalmente y muy difícilmente pudieron ser encontradas en el interior de los hepatocitos. Sin embargo, los hepatocitos presentan abundantes partículas pequeñas en el citoplasma, lo que hace pensar que cualquier partícula con un diámetro de 4 nm o inferior podría cruzar las membranas de los hepatocitos sin dificultad. Las escasas partículas grandes encontradas en muy contadas ocasiones en los hepatocitos están siempre limitadas por membranas, lo que podría impedir su tránsito hacia el núcleo celular. Las partículas pequeñas en cambio sí pudieron ser observadas en el núcleo de la célula. Algunos autores han descrito que el proceso de entrega génica mediante transferencia hidrodinámica ocurre como consecuencia de la formación de poros (hidroporación) [100] o la rotura de membrana [101] por el violento flujo de la solución génica. Sin embargo, basados en nuestras observaciones, nosotros consideramos que el proceso ocurre sin causar disrupción de la membrana

plasmática en ningún caso [102], mediante la permeabilización más permisiva de la membrana para partículas de menor tamaño. Las partículas grandes entran formando parte de vesículas endocíticas.

La suma de estas observaciones sugiere que la membrana celular y la envoltura nuclear en los hepatocitos limitan al acceso a partículas con un diámetro superior a los 15 nm. Este es un dato a tener en cuenta en el diseño de los plásmido y de cualquier partícula que haya de ser transfectada con el propósito de alcanzar el núcleo del hepatocito de forma pasiva.

Modelos de hidrofeción hepática “ex vivo” en segmentos hepáticos humanos

Los resultados confirmaron en cerdo que el procedimiento de la hidrofeción hepática, en cualquiera de los tres modelos testados, es una técnica segura y media una traducción eficiente de la proteína en tejido. Por algún defecto en la exportación debido a diferencias interespecie, la proteína no es liberada al torrente sanguíneo. La resolución de este problema en el modelo de cerdo requeriría más estudios que sobrepasan los objetivos de esta tesis. Nuestro principal objetivo era evaluar el potencial de la hidrofeción y desarrollar procedimientos que sienten las bases para trasladar esta estrategia terapéutica a la clínica. En este sentido, avanzamos un paso en el proceso traslacional y decidimos estudiar la eficiencia de la hidrofeción en tejido hepático humano, algo que no se había hecho con anterioridad.

Para realizar este estudio, se utilizaron segmentos hepáticos humanos procedentes de resecciones quirúrgicas debidas a la presencia de un tumor. Estos segmentos presentan una vena suprahepática donde se emplaza y fija el catéter antes de llevar a cabo la perfusión de la solución génica. El uso de solución de contraste y escopia de Rx nos permitió confirmar el vaso utilizado y el área de perfusión. En primera instancia, debíamos establecer las condiciones óptimas de perfusión, como en el caso del modelo porcino. Para estos primeros ensayos decidimos utilizar también el gen de la proteína fluorescente verde porque nos iba a permitir de una manera rápida y sencilla determinar la expresión de la proteína en tejido por medio de microscopía de fluorescencia. Se utilizaron las velocidades 1, 10 y 20 ml/s. Cada segmento hepático es diferente y existen grandes variaciones en el peso total del mismo, por eso el volumen utilizado para la inyección del gen siempre estaba relacionado con el peso del segmento. Para 1 y 10 ml/s empleamos siempre la relación volumen/peso (ml/g) de 1/5 mientras que para la velocidad de 20 ml/s se utilizaron las relaciones 1/5 y 1/10, para evaluar si el uso de la máxima velocidad y el máximo volumen podían interferir en la eficiencia de la hidrofección. Del mismo modo que en el modelo de cerdo, se evaluaron la entrega del gen, su transcripción y la expresión de la proteína en el tejido. Hay que considerar que las condiciones *ex vivo* de este experimento hacen que el índice de entrega sea aparente. Es aparente porque no existe proceso de aclaramiento circulatorio y cuando se analizan las muestras no es posible discernir si el gen se encuentra en el interior celular, en el espacio

intersticial o en los vasos. Sin embargo, debemos considerar que todos los segmentos se realizaron del mismo modo, lo cual nos ayuda a establecer las mejores condiciones de transferencia y que las muestras son analizadas después de 1 y 2 días de cultivo del tejido post-transfección, lo cual permite que el ADN no internalizado pueda ser hidrolizado en su mayor parte.

- Análisis molecular con el gen marcador *eGFP*

Los resultados mostraron que el mayor índice de entrega génica se alcanzó cuando la perfusión se llevó a cabo a 20 ml/s. La entrega observada con 1 y 10 ml/s era muy similar. Además a igualdad de condiciones de velocidad de flujo, un mayor volumen favorecía la entrega del gen. No podemos comparar este resultado con los modelos *in vivo* debido al proceso de lavado existente en estos. El hecho de que en el segundo día tras la transfección aparezca más cantidad de plásmido puede deberse a que el ADN genómico celular pudiera sufrir una mayor degradación relativa.

En cuanto a la transcripción, se observó que los dos grupos perfundidos a 20 ml/s y el de 10 ml/s alcanzaron unos índices de transcripción del gen muy similares. Sin embargo, el grupo transfectado a 1 ml/s medió una transcripción muy inferior, lo que sugiere que la entrega calculada correspondía mayoritariamente a plásmido extracelular. El aumento del índice de transcripción el día 2 puede deberse bien a la mayor degradación relativa del ARN propio de la célula o más probablemente al proceso continuado de transcripción del gen. Los índices de transcripción obtenidos tras hidrofección de *eGFP* en humanos fueron más de 10 veces

superiores a los alcanzados en cerdo con el mismo gen y con el mismo periodo de expresión.

Para concretar las condiciones que mediaban la mejor relación ARN transcrito/ADN entregado calculamos la actividad intrínseca de transcripción del gen. Los resultados de este cálculo mostraron que la velocidad de 10 ml/s media la mejor relación, lo que quiere decir que el ADN entregado bajo esas condiciones presenta una mayor biodisponibilidad para ser utilizado por la maquinaria de decodificación de la célula huésped. Esto no quiere decir que la biodisponibilidad fuera baja en las otras condiciones y en este sentido la presencia de la proteína eGFP pudo ser determinada tanto en las muestras de segmentos transfectados a 10 ml/s (fluorescencia) como en las que fueron transfectadas a 20 ml/s y con un volumen 1/10 (inmunohistoquímica).

La expresión de la proteína intracelular pudo ser determinada por microscopía de fluorescencia a las 24 horas de la transfección contrastando con lo que ocurría en el modelo porcino, en el que la presencia de la proteína era difícilmente detectable incluso con un ELISA de alta sensibilidad, utilizando la misma construcción génica. Esto sugiere que durante las primeras horas tras la transferencia génica en hígado, la expresión de la proteína podría estar bloqueada en los hepatocitos del cerdo. Anteriormente se ha descrito que el promotor de citomegalovirus puede sufrir un proceso de apantallamiento de su expresión en el hígado pero eso sucede a medio o largo plazo y no debiera ser la causa por la cual no se detecta la proteína.

Con estos experimentos confirmamos que el procedimiento de la hidrofeción es capaz de transferir un gen exógeno al tejido hepático humano y que además éste alcanza el hepatocito con capacidad para ser transcrito y traducido eficientemente. Además permitieron determinar las condiciones bajo las cuales el procedimiento resulta más eficaz. Esta información nos permitió seguir avanzando y evaluar la eficiencia de la hidrofeción en tejido hepático humano empleando un gen terapéutico.

Las características de esta intervención suponen un trabajo quirúrgico en banco que se asemeja al que se realiza en las intervenciones de trasplante hepático. Teniendo en cuenta esta circunstancia y con la intención de abrir el abanico de posibilidades terapéuticas para la hidrofeción, decidimos utilizar un gen que pudiera tener un interés en patologías o situaciones clínicas adquiridas como el trasplante de órganos, especialmente de hígado.

El principal problema que presentan los pacientes que reciben el órgano de un donante consiste en la activación de una respuesta inmune que conlleva el rechazo del órgano a corto o medio plazo. En la actualidad este problema se trata con fármacos inmunosupresores. Estos medicamentos tienen un estrecho margen terapéutico y pueden provocar severos efectos adversos. La reacción inmune se desencadena durante las primeras horas post trasplante y si en esos primeros momentos no se frena o modula ya es muy difícil actuar sobre ella *a posteriori*. Pensamos que si se fuera posible expresar de manera local y transitoria una proteína inmunomoduladora en el hígado, como la IL-10, se podría,

en concomitancia o no con los fármacos inmunosupresores, crear un entorno de tolerancia que mejoraría la aceptación del órgano trasplantado. Con esa idea en mente se diseñó un plásmido que contiene la secuencia codificante del gen *hIL10* con un promotor que permite una expresión moderada y temporal del mismo.

- Análisis molecular con el gen terapéutico *hIL10*

Del mismo modo que con el gen eGFP, los segmentos hepáticos humanos procedentes de resección quirúrgica fueron transfectados con el gen *hIL10* a través de un catéter implantado en la vena hepática y se cuantificaron los índices de entrega génica, transcripción y traducción. Para este ensayo decidimos medir la influencia de la hidrofección en áreas más alejadas del punto de la inyección y por eso, a pesar de que los mejores resultados habían sido obtenidos a 10 ml/s, utilizamos las velocidades de 10 y 20 ml/s con un volumen equivalente a 1/5 del peso del segmento.

Los resultados mostraron que en la zona de máxima influencia de la transfección, el índice de entrega fue ligeramente superior con la velocidad de 10 ml/s y éste iba menguando conforme nos alejábamos de esta zona. Con 20 ml/s, la distribución de la entrega del gen fue más homogénea, sugiriendo que la solución llegó a la zona más alejada con posibilidad de acceder al interior celular.

En cuanto a la transcripción, los resultados muestran un aumento general entre el día 1 y el día 3, lo que puede ser debido a que la maquinaria celular es capaz de continuar expresando el gen durante más de 72 horas en cultivo. La distribución no resultó tan

homogénea como la entrega. Se puede observar que en general, la velocidad de 20 ml/s medió una transcripción ligeramente superior. Cuando lo comparamos con el índice de transcripción del gen *eGFP*, se observa que éste se transcribe aproximadamente 10 veces más y esto se puede deber a la utilización del promotor CMV.

Para acabar de verificar la eficiencia del procedimiento en la expresión de la proteína, en unos valores con significado clínico, se realizó un ELISA. Los resultados mostraron unos índices de traducción de la proteína en tejido relativamente elevados, llegando a alcanzar entre 100 y 1,000 copias por célula, siendo su expresión ligeramente superior cuando la perfusión se llevó a cabo a 20 ml/s. Tratándose de una proteína que de manera constitutiva no se expresa en los hepatocitos, los resultados son muy positivos. Se consigue un incremento de expresión de la proteína con respecto tanto a los controles como a los días 0 de los hígados transfectados.

Futuro de nuestra investigación

El presente trabajo de tesis se planteaba como principal objetivo evaluar el potencial interés clínico de la hidrofección y el desarrollo de procedimientos seguros y eficaces que pudieran alcanzar el uso humano tras pasar el proceso traslacional. En este sentido, el futuro de nuestra investigación consiste en demostrar la idoneidad de plantear el uso clínico de este procedimiento a través de la obtención de resultados positivos en ensayos preclínicos realizados sobre modelos humanos cercanos a la práctica clínica. Siguiendo esta premisa, en nuestro laboratorio hemos conseguido autorización para utilizar segmento humanos de colon también con el fin de evaluar la eficiencia de la terapia génica en general y de la hidrofección en particular para el tratamiento de patologías como la enfermedad de Crohn o el cáncer (con plásmidos codificando adenovirus oncolíticos [103, 104]). Además se trabaja en la implementación de estrategias de construcción de plásmidos minicirculares [105], que han mostrado ser muy seguros. Como meta idónea final, se está trabajando ya en el diseño de una estrategia de edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9 [106] para reparar el gen de la hAAT, lo que podría suponer un tratamiento curativo permanente de la enfermedad.

Además, estamos trabajando en el desarrollo de un modelo preclínico de hígado humano entero *ex vivo*. Consiste en el mantenimiento del órgano entero *ex vivo* con perfusión continua de nutrientes que simulen la circulación normal del hígado. Este modelo permitiría evaluar la exportación de proteínas plasmáticas al fluido circulante simulando su salida al torrente sanguíneo y

determinar si un órgano humano es capaz de secretar la proteína codificada por un gen humano transferido, como si de una proteína constitutiva se tratara. Establecería un modelo muy próximo a la clínica que, de obtener resultados positivos, acercaría la posibilidad de desarrollar ensayos clínicos.

Hidrofección hepática no viral

CONCLUSIONES

Hidrofección hepática no viral

Una vez analizados todos los datos mostrados en la presente tesis utilizando tanto genes marcadores como genes de interés terapéutico concluimos que la hidrofeción hepática es un procedimiento de transferencia génica seguro y eficiente con gran potencial de interés clínico traslacional. Esta conclusión general se desprende de las siguientes conclusiones parciales:

1. La transferencia génica mediada por hidrofeción hepática de ADN desnudo es un procedimiento seguro para el animal y no causa reacciones adversas ni alteraciones en las funciones vitales del mismo. La eficiencia de esta estrategia está directamente relacionada con el grado de cierre vascular del órgano, de manera que cuanto más estanco está el hígado, mayor es la eficacia de traducción de la proteína codificada por el gen transferido.
2. Las condiciones de perfusión más violentas conducen a resultados más pobres y más riesgos para el paciente. Utilizando el gen terapéutico *hAAT* en el hígado vascularmente aislado y una hidrofeción bajo condiciones suaves (200 ml y 10 ó 20 ml/s) se puede alcanzar una traducción tisular del mismo orden que la obtenida en el modelo *gold standard* de ratón, que alcanza una concentración plasmática terapéutica de la proteína.

3. No se requiere una entrega génica muy elevada para una traducción eficiente de la proteína. Por el contrario, se ha visto que un exceso de ADN exógeno puede reducir la eficacia del procedimiento.
4. En el modelo porcino, la principal limitación de la hidrofección empleando el gen humano de la alfa-1-antitripsina, consiste en la dificultad de exportar la proteína traducida al torrente sanguíneo. Esta limitación debe de ser causada por diferencias interespecies en la maduración y/o exportación de la proteína, lo cual podría ser resuelto utilizando tejido humano.
5. Nuestros resultados muestran que las membranas en el tejido suponen unas barreras al paso de partículas a través de ellas, estando el diámetro máximo permitido para alcanzar el núcleo de los hepatocitos cercano a los 4 nm. Estos datos sugieren que la entrega génica a los hepatocitos se verifica por un proceso de difusión a través de la membrana sin solución de continuidad de la misma.
6. Los resultados obtenidos en segmentos hepáticos humanos confirman la eficiencia de traducción de la proteína de interés terapéutico y el potencial interés traslacional del procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Hidrofección hepática no viral

- [1] Thomas F. Kresina and Andrea D. Branch. En: Edited by Thomas F. Kresina. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. Wiley-Liss, Inc. 2001:1-24.
- [2]. Kay MA (2011) State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 12: 316-28
- [3]. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7(1):33-40.
- [4] Hao Yin, Rosemary L. Kanasty, Ahmed A. Eltoukhy, Arturo J. Vegas, J. Robert Dorkin & Daniel G. Anderson. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014 Aug;15(8):541-55.
- [5] Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*. 2014 Jan 1;459(1-2):70-83.
- [6] Kamimura K, Suda T, Zhang G and Liu D. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceut Med*. 2011 October 1; 25(5): 293–306
- [7] Taniyama Y, Azuma J, Kunugiza Y, Iekushi K, Rakugi H, Morishita R. Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(15):1630-7.
- [8] Dasí F, Benet M, Crespo J, Crespo A, Aliño SF (2001) Asialofetuin liposome-mediated human alpha 1-antitrypsin gene transfer in vivo results in stable long-term gene expression. *J Mol Med* 79:205–212.
- [9] Chemin I, Moradpour D, Wieland S, et al. Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly

efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo. *J Viral Hepat.* 1998; 5:369–75.

[10] Li S. Electroporation gene therapy. Preface. *Methods Mol Biol.* 2008; 423:v-vii.

[11] Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther.* 2010 Aug; 10(4):312-7.

[12] Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol.* 2013 Dec 26;3(4):39-44.

[13] Plank C, Anton M, Rudolph C, et al. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert Opin Biol Ther.* 2003; 3:745–58.

[14] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Ther.* 2006; 13:283–7.

[15] Yang NS, Burkholder J, Roberts B, et al. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:9568–72.

[16] Wang S, Joshi S, Lu S. Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol Biol.* 2004; 245:185–96.

[17] Langer B, Renner M, Scherer J, Schüle S, Cichutek K. Safety assessment of biolistic DNA vaccination. *Methods Mol Biol.* 2013;940:371-88.

- [18] Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects:hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* 2007 Jan;14(2):99-107.
- [19] Suda, T. & Liu, D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 15, 2063-9 (2007).
- [20] Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J (2013) Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* 15: 65–77.
- [21] Wiley database on Gene Therapy Trials Worldwide (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>)
- [22] Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA (1996) Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* 3: 593–598.
- [23] Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA (1997) Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 8 1763–1772.
- [24] Zhang G, Budker V, Wolff JA (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*10:1735–1737.
- [25] Liu F, Song Y, Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6: 1258–1266.

- [26] Wang Z, Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY, Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2001 Oct;8(10):751-8
- [27] Aliño SF, Crespo A, Dasí F (2003) Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther* 10(19):1672-9.
- [28] Gao M, Ma Y, Cui R, Liu D. Hydrodynamic delivery of FGF21 gene alleviates obesity and fatty liver in mice fed a high-fat diet. *J Control Release.* 2014 Jul 10;185:1-11.
- [29] Ma Y, Liu D. Hydrodynamic delivery of adiponectin and adiponectin receptor 2 gene blocks high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Gene Ther.* 2013 Aug;20(8):846-52.
- [30] Sun H, Liu D. Hydrodynamic delivery of interleukin 15 gene promotes resistance to high fat diet-induced obesity, fatty liver and improves glucose homeostasis. *Gene Ther.* 2014 Dec 11. doi: 10.1038/gt.2014.114.
- [31] Zhang X, Collins L, Sawyer GJ, Dong X, Qiu Y, Fabre JW (2001) In vivo gene delivery via portal vein and bile duct to individual lobes of the rat liver using a polylysine-based nonviral DNA vector in combination with chloroquine. *Hum Gene Ther* 12:2179–2190.
- [32] Sawyer GJ, Zhang X, Fabre JW (2010) Technical requirements for effective regional hydrodynamic gene delivery to the left lateral lobe of the rat liver. *Gene Ther* 17:560–564.
- [33] Eastman SJ, Baskin KM, Hodges BL, et al (2002) Development of catheter-based procedures for transducing the

isolated rabbit liver with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 13:2065–2077.

[34] Herrero MJ, Dasi F, Noguera I, et al (2005) Mouse and pig nonviral liver gene therapy: success and trials. *Gene Ther Mol Biol* 9:169–180.

[35] Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E (2006) Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 13:1696–1702.

[36] Aliño SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasí F, Sánchez M (2007) Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism. *Gene Ther* 14:334–343.

[37] Fabre JW, Grehan A, Whiterhorne M, et al (2008) Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther* 15:452–462.

[38] Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther.* 2009 Apr;9(2):128-35.

[39] Kamimura K, Suda T, Xu W, Zhang G, Liu D (2009) Image-guided, Lobe-specific Hydrodynamic Gene Delivery to Swine Liver. *Mol Ther* 17(3):491-9.

[40] Fabre JW, Whitehorne M, Grehan A, et al (2011) Critical, physiological and surgical considerations for hydrodynamic

pressurization of individual segments of the pig liver. *Hum Gene Ther* 22(7):879-87.

[41] Kamimura K, Suda T, Zhang G, Aoyagi Y and Liu D. Parameters affecting image-guided, hydrodynamic gene delivery to swine liver. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Oct 15;2:e128

[42] Horwich AL. Inherited hepatic enzyme defects as candidates for liver-directed gene therapy *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991; 168:185-200.

[43] Strauss M. Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Therapy* 1994; 1: 156–164.

[44] Davern TJ. Molecular therapeutics of liver disease. *Liver Dis* 2001; 52: 381–414.

[45] Timothy P, O'Connor and Ronald G. Crystal. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* 2006 April, 4 261-282

[46] Brunetti-Pierri N, Ng P. Progress & Prospects: Gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther*, 15:553-60, 2008.

[47] Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. 2011 Aug;105(8):1129-39.

[48] Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*. 2002 Dec;102(12):4751-804.

- [49] Kelly E, Greene CM, Carroll TP, McElvaney NG, O'Neill SJ. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med*. 2010 Jun;104(6):763-72.
- [50] Aboussouan LS, Stoller JK. Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: a review. *Respir Med*. 2009 Mar;103(3):335-41.
- [51] Stoller JK, Aboussouan LS. A review of α 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Feb 1;185(3):246-59.
- [52] Flotte TR, Mueller C. Gene therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(R1):R87-92.
- [53] Aliño SF, Bobadilla M, Garcia-Sanz M, Lejarreta M, Unda F, Hilario E. In vivo delivery of human alpha 1-antitrypsin gene to mouse hepatocytes by liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Apr 15;192(1):174-81.
- [54] Aliño SF, Crespo J, Bobadilla M, Lejarreta M, Blaya C, Crespo A. Expression of human alpha 1-antitrypsin in mouse after in vivo gene transfer to hepatocytes by small liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov 15;204(3):1023-30.
- [55] Aliño SF, Bobadilla M, Crespo J, Lejarreta M. Human alpha 1-antitrypsin gene transfer to in vivo mouse hepatocytes. *Hum Gene Ther*. 1996 Mar 1;7(4):531-6.8.
- [56] Crespo J, Blaya C, Crespo A, Aliño SF. Long-term expression of the human alpha1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vectors. *Biochem Pharmacol*. 1996 May 17;51(10):1309-14.

[57] Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, Liu T, Finegold M, Darlington G, Pokorny W, et al. Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 1;89(1):89-93.

[58] Kay MA, Graham F, Leland F, Woo SL. Therapeutic serum concentrations of human alpha-1-antitrypsin after adenoviral-mediated gene transfer into mouse hepatocytes. *Hepatology*. 1995 Mar;21(3):815-9.

[59] Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics based procedure. *Gene Ther*. 2000 Aug;7(15):1344-9.

[60] Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy- review of a new approach. *Pharmacol Rev*. 2003 Jun;55(2):241-69

[61] Markus Friedrich, Wolf-Dietrich DoÈcke, Anja Klein, Sandra Philipp, Hans-Dieter Volk, Wolfram Sterry, and Khusru Asadullah. Immunomodulation by Interleukin-10 Therapy Decreases the Incidence of Relapse and Prolongs the Relapse-free Interval in Psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2002 Apr;118(4):672-7.

[62] Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jun;4(6):754-9. Epub 2006 May 22.

- [63] Huang YH, Chen YX, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Hydrodynamics-based transfection of rat interleukin-10 gene attenuates porcine serum-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the activation of hepatic stellate cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):677-86.
- [64] Sendra L, Miguel A, Herrero MJ et al. Human Interleukin-10 Naked DNA Delivery to Infarcted Pig Heart by Catheter Mediated Retrograde Injection in Coronary Sinus. *J Clin Exp Cardiol* 2014, 5:6
- [65] Brikci-Nigassa L, Matsuyama M, Hase T, Eljaafari A, Chargui J, Sanhadji K, Inori F, Nakatani T, Yoshimura R, Touraine JL. Prope tolerance to heart allografts in mice associated with persistence of donor interleukin-10-transduced stem cells. *Transplantation*. 2012 Apr 27;93(8):761-8.
- [66] Niu J, Yue W, Song Y, Zhang Y, Qi X, Wang Z, Liu B, Shen H, Hu X. Prevention of acute liver allograft rejection by IL-10-engineered mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jun;176(3):473-84
- [67] Lilly LB, Ding J, Levy GA. The immunology of hepatic allograft rejection. En: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell ME. *Transplantation of the liver*. Lippincott Williams & Wilkins 2001: 211-27.
- [68] Wight D. Liver transplantation. En: Thiru S, Waldmann H. *Pathology and immunology of transplantation and rejection*. Blackwell Science Ltd 2001; 262-99.

- [69] Carreño O, Sendra L, Montalvá E, et al (2013) A Surgical Model for Isolating the Pig Liver in vivo for Gene Therapy. *Eur Surg Res* 51(1-2):47-57.
- [70] de Groot GH, Reuvers CB, Schalm SW, Boks AL, Terpstra OT, Jeekel H, ten Kate F, Bruinvels J. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res*. 1987 Jan;42(1):92-100
- [71] Lee KU, Zheng LX, Cho YB, Kim KH, Ha J, Suh KS, Jung SE. An experimental animal model of fulminant hepatic failure in pigs. *J Korean Med Sci*. 2005 Jun;20(3):427-32
- [72] Seldinger SI (1953) Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta Radiol* 39(5):368-76.
- [73] Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G et al (2012) DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther* 19(5):504-12.
- [74] Masiá S., Alvarez S., de Lera A. R., Baretino D. (2007) *Mol. Endocrinol.* 21, 2391–2402.
- [75] Niwa H, Inouye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima S, Kubota M, Ohashi M, Tsuji FI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13617-22. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein.
- [76] Sendra L, Pérez D, Miguel A, Herrero MJ, Noguera I, Díaz A, Baretino D, Marti-Bonmati L, Aliño SF. Human AAT gene transfer to pig liver improve by using a perfusion isolated organ

endovascular procedure. *Eur Radiol* 2015 (Aceptado para publicación).

[77] NCBI protein database.

www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001002235.1

[78] NCBI protein database.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAK38162.1>

[79] NCBI Genome Database. www.ncbi.nlm.nih.gov/genome.

[80] Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th edn. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science, Chapter 6: From DNA to RNA. Available via www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887.

[81] Lodish H (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edn. In: Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Chapter 3. New York: W. H. Freeman.

[82] Brown TA (2002) *Genomes*, 2nd Edn.. Oxford: Wiley-Liss. Chapter 3: Transcriptomes and Genomes. Available via www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21121.

[83] Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem* 2006; 110: 157–160.

[84] Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther*. 2009 Apr;9(2):128-35.

[85] Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D (2007) Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther* 14:129–13.

[86] Rácz Z, Godó, Révész C, Hamar P. Immune activation and target organ damage are Consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice. *Nucleic Acid Ther* 2011; 21(3):215-24.

[87] Sawyer GJ, Dong X, Whitehorne M, et al (2007) Cardiovascular function following acute volume overload for hydrodynamic gene delivery to the liver. *Gene Ther* 14(16):1208-17.

[88] Aliño SF, Herrero MJ, Bodí V, Noguera I, Mainar L, Dasí F, Sempere A, Sánchez M, Díaz A, Sabater L, Lledó S. Naked DNA delivery to whole pig cardiac tissue by coronary sinus retrograde injection employing non-invasive catheterization. *J Gene Med* 2010; 12: 920–926.

[89] Walter P, Ron D (2011) The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334:1081-1086.

[90] Balagopal V. and Parker R. Polysomes, P bodies and Stress granules: States and Fates of Eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Jun; 21(3):403-8. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.005.

[91] Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol* 2002; 18:575-99

[92] Cargnello M, Tcherkezian J, Dorn JF, Huttlin E, Maddox P, Gygi S and Roux P. Phosphorylation of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E/Transporter (4E-T) by c-Jun N-Terminal Kinase

Promotes Stress-Dependent P-Body Assembly. *Mol Cell Biol.* 2012 Nov;32(22):4572-84. doi: 10.1128/MCB.00544-12.

[93] Base de datos del NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAB59375.1>. Consultado en fecha: Marzo 2015.

[94] Base de datos del NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA37132.1>. Consultado en fecha: Marzo 2015.

[95] Base de datos del NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA61259.1>. Consultado en fecha: Marzo 2015.

[96] Herrero MJ, Monleon D, Morales JM, Mata M, Serna E and Aliño SF. Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by hydrodynamic DNA injection. *Curr. Top. Gen.* 2010; Vol. 4: 43-54.

[97] Herrero MJ, Monleon D, Morales JM, Mata M, Serna E, Aliño SF. Analysis of Metabolic and Gene Expression Changes after Hydrodynamic DNA Injection into Mouse Liver. *Biol. Pharm. Bull* 2011; 34(1) 167—172.

[98] Kamimura K, Kanefuji T, Yokoo T, Abe H, Suda T, Kobayashi Y, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Safety assessment of liver-targeted hydrodynamic gene delivery in dogs. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e107203.

[99] Aliño SF, Escrig E, Revert F, M. Guillem VM and Crespo A. Pharmacodynamic approach to study the gene transfer process

employing non-viral vectors. *Biochem Pharmacol.* 2000 Dec 15;60(12):1845-53.

[100] Zhang G, Gao X, Song YK, et al (2004) Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 11:675–682.

[101] Sebestyén MG, Budker VG, Budker T, Subbotin VM, Zhang G, Monahan SD et al. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med* 2006; 8: 852–873.

[102] Crespo A, Peydro A, Dasi F, et al (2005) Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Ther* 12:927–935.

[103] Alemany R. Viruses in cancer treatment *Clin Transl Oncol.* 2013 Mar;15(3):182-8

[104] Gil-Hoyos R, Miguel-Camacho J, Alemany R. Oncolytic adenovirus characterization: activity and immune responses. *Methods Mol Biol.* 2014;1089:117-32.

[105] Viecelli HM, Harbottle RP, Wong SP, Schlegel A, Chuah MK, VandenDriessche T, Harding CO, Thöny B. Treatment of phenylketonuria using minicircle-based naked-DNA gene transfer to murine liver. *Hepatology.* 2014 Sep;60(3):1035-43.

[106] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23

