



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Cirugía

**TESIS DOCTORAL**

**MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL  
PARA TRANSFERENCIA GÉNICA HEPÁTICA  
EN UN ÓRGANO AISLADO *IN VIVO***

Tesis presentada por: **D. OMAR CARREÑO SAENZ**  
Licenciado en Medicina y Cirugía

Dirigida por:

Dr. D. Rafael López Andújar  
Dra. Dña. Eva M<sup>a</sup> Montalvá Orón  
Prof. D. Salvador F. Aliño Pellicer

Valencia 2017





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

Doctorado de Medicina  
Departamento de Cirugía

Programa de doctorado regulado Real Decreto 1393/2007

**MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL  
PARA TRANSFERENCIA GÉNICA HEPÁTICA  
EN UN ÓRGANO AISLADO *IN VIVO***

Autor: D. Omar Carreño Sáenz

Dirigida por:

Dr. D. Rafael López Andújar  
Dra. Dña. Eva M<sup>a</sup> Montalvá Orón  
Dr. D. Salvador F. Aliño Pellicer

Valencia 2017





**D. RAFAEL LÓPEZ ANDÚJAR**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia y Jefe de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**D<sup>a</sup>. EVA M<sup>a</sup> MONTALVÁ ORÓN**, Doctora en Medicina y Cirugía, Médico adjunto del Servicio de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**D. SALVADOR ALIÑO PELLICER**, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Valencia. Médico Especialista de Área. Unidad de Farmacología Clínica. Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

#### CERTIFICAN

Que el licenciado en Medicina y Cirugía, **OMAR CARREÑO SAENZ**, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, el trabajo titulado: “**MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL PARA TRANSFERENCIA GÉNICA HEPÁTICA EN UN ÓRGANO AISLADO *IN VIVO***” que se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, firmamos la presente en Valencia a 31 de marzo de 2017

D. Rafael López Andújar

Dña. Eva M<sup>a</sup> Montalvá Orón

D. Salvador F. Aliño Pellicer



*A María*

*A mis padres y hermanos*



A María por darme las fuerzas que necesité para terminar este proyecto, por siempre estar ahí para mí. Por las tardes de estudios juntos, por tu cariño y apoyo incondicional. Gracias por hacerme la vida, vida.

A mi familia aquí en Valencia, muchas gracias por siempre estar pendiente de mí.

A mis hermanos, por alegrarse por mis logros a pesar de la distancia. Les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.

A mi madre porque sin ella esto no podría haber sido posible, gracias por ser mi constante motivación, por esa mujer emprendedora y luchadora que eres. Gracias por todo mamá.

“Viejo” este proyecto y este esfuerzo es para ti, donde sea que estés gracias por todo.



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis no hubiera podido ser posible sin el apoyo, la colaboración y confianza de un grupo de personas a las que quiero transmitir mi más sincero agradecimiento.

A Rafael López Andújar, director de mi tesis, por confiar en mi para realizar este proyecto de investigación. Gracias de todo corazón.

A Eva Montalva Orón, mi directora de tesis, por su confianza y dedicación, por siempre estar presente, por las riñas para acabarla, por el empuje diario a terminar este proyecto, gracias por todo.

A Salvador Aliño Pellicer, mi director de tesis, por su pasión por la investigación, por su esfuerzo, asesoramiento y dedicación.

A Luis Sendra Gisbert, por su apoyo desinteresado, por su confianza y dedicación.

A Francisco Orbis Castellanos, por su apoyo, enseñanzas y por las mañanas de quirófano en el animalario, muchas gracias Paco.

A “Salva” Pous, por haber formado parte de esto y de más, gracias maestro, eres mi ejemplo a seguir.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en especial a José y Javier, por el apoyo recibido durante todo este tiempo.

Gracias a los servicios de Animalario de la Universitat de València y del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe por brindarme el apoyo y por estar siempre dispuestos a todo.

Espero no olvidarme nombrar a nadie, y si lo hago, mis más sinceras disculpas.





# Índice

---



---

# ÍNDICE

<b>1. Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Introducción .....</b>	<b>11</b>
3.1. Terapia génica .....	13
3.1.1. Modalidades de terapia génica.....	14
3.1.1.1. Terapia génica de células germinales.....	14
3.1.1.2. Terapia génica de células somáticas.....	15
3.2. Transferencia génica .....	20
3.2.1. Tipos de genes integrados.....	20
3.2.2. Métodos de transferencia génica.....	22
3.2.3. Vectores utilizados para la transferencia génica.....	23
3.2.3.1. Vectores fisicoquímicos o no virales .....	23
3.2.3.2. Vectores virales.....	30
3.3. Aplicaciones de la terapia génica.....	33
3.3.1. Enfermedades monogénicas.....	33
3.3.2. Cáncer y terapia génica.....	35
3.3.3. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y Terapia génica .....	43
3.4. Limitaciones éticas de la terapia génica.....	46
3.5. Legislación sobre la terapia génica .....	48
3.5.1. Consideraciones generales sobre la terapia génica somática.....	48
3.5.2. Consideraciones generales sobre la terapia génica germinal.....	50
3.5.3. Legislación general .....	50
3.5.4. Regulación de los proyectos de terapia génica en España.....	52
3.6. Limitaciones técnicas de la terapia génica.....	54
3.7. Anatomía hepática del cerdo.....	56
3.7.1. Sistema venoso portal extrahepático.....	59
3.7.2. Sistema venoso cava inferior .....	59
3.7.3. Vesícula biliar .....	60
3.8. Anatomía microscópica del hígado del cerdo.....	61

---

3.8.1. Origen embrionario del hígado.....	61
3.8.2. Estroma hepático .....	61
3.8.3. Parénquima hepático.....	61
3.8.4. Espacio porta o de Kiernan.....	66
3.9. Fisiología hepática.....	68
3.9.1. Metabolismo de los carbohidratos .....	68
3.9.2. Metabolismo de las proteínas .....	69
3.9.3. Metabolismo de los lípidos.....	69
3.9.4. Hemostasia.....	70
3.9.5. Secreción de bilis.....	70
3.10. Justificación del estudio .....	71
<b>4. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>75</b>
4.1. Hipótesis del estudio .....	75
4.2. Objetivos del estudio.....	76
4.2.1 Objetivo principal .....	76
4.2.2. Objetivos secundarios.....	76
<b>5. Material y métodos .....</b>	<b>79</b>
5.1. Diseño del estudio .....	79
5.2. Población del estudio .....	80
5.3. Construcción del plásmido .....	81
5.3.1. Plásmido con la proteína verde fluorescente (eGFP). .....	81
5.3.2. Interleuquina 10 (Il-10). .....	81
5.4. Protocolo anestésico y preparación pre-quirúrgica.....	83
5.5. Equipo y material quirúrgico .....	85
5.6. Fases del estudio.....	87
5.7. Toma de muestras sanguíneas.....	90
5.8. Muestras de tejido hepático y acondicionamiento .....	91
5.9. Análisis cuantitativo del ADN y ARN por PCR y RT-PCR.....	93
5.9.1. Determinación de la entrega del gen en el tejido hepático .....	93
5.9.2. Determinación de la transcripción del gen .....	93
5.10. Determinación de la proteína .....	95
5.10.1. Determinación de la proteína eGFP.....	95

---

5.10.2. Determinación de la proteína IL-10.....	96
5.11. Expresión de los resultados moleculares .....	97
5.12. Tratamiento de los datos .....	98
5.13. Definiciones .....	100
5.13.1 Plásmido.....	100
5.13.2. Promotor .....	100
5.13.3 Lugar de restricción .....	101
5.13.4. Espectrofotometría.....	101
5.13.5. Exclusión vascular total hepática.....	101
5.13.6. Periodo de incubación.....	101
5.13.7. Periodo de postincubación .....	101
5.13.8. Transfección.....	101
5.13.9. Absorbancia .....	102
5.13.10. Reacción colorimétrica .....	102
5.13.11. Actividad intrínseca .....	102
5.13.12. Reacción en cadena de polimerasa .....	102
5.13.13. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.....	103
5.13.14. Retrotranscripción.....	103
5.13.15. Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa.....	103
<b>6. Resultados.....</b>	<b>107</b>
6.1. Desarrollo del modelo quirúrgico .....	107
6.1.1. Modelo quirúrgico 1 .....	108
6.1.2. Modelo quirúrgico 2 .....	110
6.1.3. Modelo quirúrgico 3 .....	111
6.2. Procedimiento de transferencia.....	114
6.2.1. Tiempo del procedimiento quirúrgico .....	114
6.3. Resultados del modelo quirúrgico 1 .....	116
6.3.1. Parámetros hemodinámicos .....	116
6.3.2. Toxicidad hepática .....	117
6.3.3. Entrega aparente del gen al tejido hepático .....	118
6.3.4. Transcripción del gen al tejido hepático .....	119
6.4. Resultados del modelo quirúrgico 2 .....	121
6.4.1. Parámetros hemodinámicos .....	121

---

6.4.2. Toxicidad hepática.....	122
6.4.3. Mortalidad del procedimiento .....	122
6.4.4. Entrega aparente del gen al tejido hepático .....	122
6.4.5. Transcripción del gen al tejido hepático.....	123
<b>6.5. Resultados del modelo quirúrgico 3.....</b>	<b>125</b>
6.5.1. Parámetros hemodinámicos .....	125
6.5.2. Toxicidad hepática.....	126
6.5.3. Mortalidad del procedimiento .....	126
6.5.4. Entrega aparente del gen al tejido hepático .....	126
6.5.5. Transcripción del gen al tejido hepático.....	127
6.6. Comparación entre los modelos quirúrgicos 2 y 3, a velocidad de 10 ml/s.	129
6.7. Comparación entre los modelos quirúrgicos 2 y 3 a velocidad de 20 ml/s	131
6.8. Traducción de la proteína eGFP en el tejido hepático. ....	133
6.9. Transferencia del gen hIL-10 con interés terapéutico.....	134
6.9.1. Índice de entrega del gen hIL-10 al tejido hepático .....	134
6.9.2. Índice de transcripción del gen hIL-10 al tejido hepático .....	136
6.9.3 Índice de traducción de la proteína hIL-10.....	137
6.9.4. Medición de la proteína hIL-10 en plasma. ....	138
<b>7. Discusión.....</b>	<b>141</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>155</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>159</b>
<b>10. Anexos.....</b>	<b>175</b>
10.1 Índice de tablas.....	175
10.2. Índice de figuras.....	176
10.3. Publicaciones.....	179
10.4. Vídeo .....	190

## 1. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ad-p53	Adenoviral p53
Adv-Tk/GCV	Adenoviral vector carrying the herpes simplex virus thymidine kinasa gen in combination with the prodrug ganciclovir
AEM	Asociación española del medicamento
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Citosina deaminasa
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMV	Citomegalovirus
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Agencia europea del medicamento
Fr	French (unidad de medida, 1Fr = 1/3 mm)
Fw	Forward
GCV	Ganciclovir
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonicacid (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico)
hIL10	Interleuquina-10 humana
IGF-10	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IMRT	Radioterapia de intensidad modulada

---

Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
LPL	Lipoprotein lipasa
mEq	Miliequivalentes
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercurio
MQ1	Modelo quirúrgico 1
MQ2	Modelo quirúrgico 2
MQ3	Modelo quirúrgico 3
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro sódico
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
p3C	Plásmido poly-III con promotor del citomegalovirus PBS Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
Pg	Picogramos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer (tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en tiempo real)



Rv	Reverse
s	Segundos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Tm	Temperatura de <i>melting</i> (temperatura de fusión)
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VMS	Vena mesentérica superior
VCS	Vena cava superior
WB	Western blot
5FC 5-	Fluorocitosina
µg	Microgramo



# Resumen

---



## 2. RESUMEN

Para realizar una terapia génica eficaz, múltiples estudios sugieren crear un ambiente adecuado con el objetivo de que el gen pueda entrar y permanecer en la célula para poder realizar su función. En este estudio se describe una estrategia quirúrgica para el aislamiento *in vivo* del hígado de cerdo, consiguiendo un órgano vascular hermético que permite, después de evaluar las condiciones de inyección génica, la creación de un modelo quirúrgico óptimo para la transferencia génica, utilizando un gen con interés terapéutico y midiendo la entrega del gen, la transcripción, la traducción y por último la proteína en sangre.

Se utilizaron 24 cerdos hembra, el estudio se realizó en 3 fases, en la primera fase (n=2) se diseñó el modelo quirúrgico, evaluando la viabilidad del mismo. Se establecieron las condiciones de la administración del gen al tejido hepático, el volumen y las velocidades de perfusión. Se definieron las dos vías para la administración del gen (vía anterógrada o vena porta y vía retrógrada o vena cava). En la segunda fase (n=14), se procedió a evaluar las dos vías de administración con las distintas condiciones establecidas con el fin de valorar el modelo quirúrgico óptimo para la realización del procedimiento. En la tercera fase (n=8), una vez establecida la vía de administración, las condiciones ideales de volumen y velocidad de perfusión, se procedió a utilizar un gen con interés terapéutico, midiendo los valores de éste en sangre diez días después de realizado el procedimiento quirúrgico.

En cuanto a la técnica quirúrgica, se crearon tres modelos que se distinguen por la vía de administración, volumen y velocidad de perfusión del gen. En estos tres modelos se realizó laparotomía media supra-infra umbilical identificando y disecando la arteria hepática, la vena porta, la vena cava suprahepática y la vena cava infrahepática, preparándolas para realizar la exclusión vascular total. A continuación, la vascularización hepática se excluyó durante 5-7 minutos. Estos procedimientos

---

fueron comunes en todos los modelos creados. En la primera fase del estudio, se creó el modelo quirúrgico 1, en el cual se administró el gen eGFP (que codifica la proteína fluorescente verde) por vena cava y vena porta simultáneamente a una velocidad de 40 y 60 ml/s con un volumen de 400 y 600 ml respectivamente. En la segunda fase del estudio se creó el modelo quirúrgico 2, en el cual se administró el gen eGFP por vena cava con velocidades de 10 y 20 ml/s con un volumen de 200 ml y también el modelo quirúrgico 3, en el cual se administró el gen eGFP por la vena porta con velocidades de 10 y 20 ml y volumen de 200 ml. En la tercera fase del estudio se utilizó el modelo quirúrgico 2 para evaluar la transferencia génica utilizando la interleuquina 10 como gen de interés terapéutico.

Las constantes vitales del animal se monitorizaron durante la cirugía para evaluar la seguridad del procedimiento. Se observaron niveles plasmáticos de enzimas hepáticas después de las 24 horas del procedimiento. Los resultados confirmaron la eficacia del procedimiento. El modelo quirúrgico 2, reveló que es más efectivo que los otros modelos en el momento de la transcripción del gen al tejido hepático y es por ello que se utilizó en la tercera fase del procedimiento empleando el gen hIL-10. La medición de la proteína IL-10 en sangre al décimo día post-procedimiento resultó significativo confirmando nuevamente la efectividad del modelo quirúrgico 2.

El procedimiento no es perjudicial para los animales y ofrece una amplia gama de opciones de administración génica porque permite diferentes formas de perfusión (anterógrada y retrógrada) y diferentes caudales para determinar las condiciones óptimas de transferencia de genes. La perfusión del gen por vena cava (vía retrograda) a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml es el procedimiento ideal para realizar una terapia génica eficaz.

Esta estrategia abre el camino para el uso de terapia celular y terapia génica hepática viral o no viral, especialmente indicada en una amplia variedad de enfermedades heredadas o adquiridas debido a la capacidad del hígado de producir y suministrar proteínas al torrente sanguíneo.

# Introducción

---





### 3. INTRODUCCIÓN

Todas las células de un organismo tienen el mismo contenido genético, y es tan importante tenerlo como activarlo en la célula que lo necesite y en el momento que surja la necesidad. Los órganos están formados, separados y comunicados por tejidos. Así cada órgano y cada tejido tienen una estructura diferente y una función propia dependiendo del tipo de célula que lo haya formado. Cada ejemplar de célula se definirá a partir de sus características específicas (componentes químicos y propiedades físicas). Toda célula se separa de otra por una envoltura llamada membrana celular. A través de ésta entran los nutrientes y se reciben o envían señales. En el interior de la célula, en el citoplasma, se degradan los nutrientes recibidos para formar componentes estructurales de la célula o señales de comunicación, siguiendo la información que se encuentra en el núcleo celular. Esta información se encuentra codificada en genes dentro de los cromosomas del núcleo de la célula. Los genes son espacios delimitados de los cromosomas, compuestos de ADN, que residen en el núcleo de todas las células del organismo. Todo gen tiene una función definida en la vida de la célula y el conjunto de proteínas que fabrique le conferirán características específicas, es decir el conjunto de genes expresados en una célula la definen como un tipo celular en concreto, con una estructura y función propia.

El conjunto de genes de una célula se denomina genoma, término acuñado en 1920 por Hans Winkler, profesor de botánica en la Universidad de Hamburgo-Alemania como acrónimo de las palabras “gene” y “cromosoma”<sup>(1)</sup>. El 26 de junio del año 2000 apareció el primer borrador del genoma humano, que fue publicado en el año 2001<sup>(2)</sup>. El 14 de abril de 2003, los científicos del Consorcio Internacional para la secuenciación del Genoma Humano anunciaron que se había completado la secuencia de todo el genoma<sup>(3)</sup>. El avance del conocimiento a partir de la secuenciación del genoma humano ha propiciado el desarrollo de herramientas de diagnóstico altamente eficaces para diferentes enfermedades, particularmente las

---

oncológicas. Se encuentran disponibles varias pruebas diagnósticas, basadas en el conocimiento sobre mutaciones en los genes como es el caso de enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, desórdenes inmunes, neurológicos y neuromusculares, entre otras<sup>(4)</sup>. Así mismo, tomando en consideración la composición genética individual, es posible en algunos casos diseñar tratamientos nuevos y altamente eficaces.

### 3.1. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica humana es la modalidad terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células diana en un paciente para corregir un defecto genético o para dotar a dichas células de una nueva función<sup>(5)</sup>.

Algunas enfermedades tienen su origen en la ausencia o en la alteración en la secuencia de ADN, que origina una transformación en la síntesis de proteínas codificadas por dicho gen. La ausencia de la proteína normal puede ocasionar diversas manifestaciones clínicas o enfermedades, según la función estructural o enzimática que normalmente ejerce dicha proteína en las células. Por ejemplo, la mutación del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 y cuya mutación altera la proteína que transporta iones cloruro a través de las células epiteliales que, a su vez, controlan la regulación de otros transportadores. En los pacientes con fibrosis quística, esta proteína está ausente o bien se encuentra en proporciones sensiblemente menores a las habituales.

El objetivo de la terapia génica es, por tanto, la introducción de los genes en las células del organismo con el fin de eliminar las consecuencias clínicas de la enfermedad genética heredada o adquirida en dicho individuo, sin que exista una transmisión del gen insertado a futuras generaciones.

Esta terapia se podría aplicar a enfermedades como el cáncer, algunos trastornos endocrinos o metabólicos, e incluso a infecciones virales como la ocasionada por el virus de la inmunodeficiencia humana <sup>(6)</sup>. Esto podría llevarse a cabo siempre que el beneficio de la aplicación de la técnica fuese mayor que el riesgo que conlleva realizarla.

Las estrategias moleculares para la terapia génica son básicamente tres:

- a) Inserción génica, que implica la inclusión/introducción de la versión normal del gen defectuoso sin modificar el gen alterado.

- 
- b) Modificación génica, en la que el gen alterado es modificado por mutagénesis dirigida.
  - c) Cirugía génica, que implica la sustitución del gen defectuoso por el gen normal.

### 3.1.1. Modalidades de terapia génica

#### 3.1.1.1. *Terapia génica de células germinales*

Es aquella dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y que, por tanto, será transmisible a la descendencia. Este tipo de terapia génica estaría indicada para la corrección de forma definitiva las enfermedades congénitas, una vez que la técnica se haya demostrado eficaz y segura.

La terapia génica de la línea germinal humana no ha sido utilizada en la práctica clínica debido a limitaciones en la tecnología de manipulación de células germinales y a consideraciones éticas. Destaca, en especial, el peligro de modificación del acervo genético de la especie humana, y el riesgo de potenciación genética, que derivaría en prácticas de eugenesia por selección artificial de genes que confiriesen caracteres ventajosos para el individuo <sup>(7)</sup>.

Se puede asumir erróneamente que la transferencia génica de la línea germinal es práctica clínica habitual. La posibilidad de elegir el sexo del futuro hijo o la implantación de un óvulo seleccionado genéticamente puede inducir al público en general a pensar que la transferencia de genes se realiza actualmente, pero en realidad este proceso, únicamente implica la selección de las células dado que no hay alteración de genes o cambio de los mismos.

En el año 2001 se confirmó el nacimiento de 30 niños genéticamente alterados cuyas madres se habían sometido a un procedimiento llamado transferencia “ooplasmic” <sup>(8)</sup>. En este proceso se inyectaron algunos componentes de un óvulo de una mujer con problemas de infertilidad y componentes del óvulo de la donante; el

resultado fue un huevo con dos tipos de mitocondrias, estructuras celulares que contienen la misma cantidad minúscula de ADN y que proporcionan energía a la célula. Los niños nacidos después de este procedimiento tuvieron tres padres genéticos, ya que aportaban el ADN de la donante, el de la madre y el del padre. Aunque los investigadores anunciaron esto como el primer caso de modificación genética de la línea germinal humana, la transferencia de genes es un efecto secundario inadvertido del procedimiento de la infertilidad.

La transferencia de genes de la línea germinal intencional implicaría la introducción deliberada de nuevo material genético en cualquiera de las células germinales (espermatozoides u oocitos) o en cigotos *in vitro* antes de la fertilización o la implantación. Recientemente el parlamento inglés aprobó la posibilidad de utilizar una técnica denominada transferencia mitocondrial dirigida a solucionar el problema de las mujeres que padecen enfermedades mitocondriales, que pueden transmitir a sus hijos<sup>(8)</sup>. El objetivo de este proceso es producir un embrión en desarrollo en el que cada célula lleve el gen recién insertado como parte de su estructura genética. Esta transferencia génica germinal tiene riesgos significativos, ya que en los casos en los que el gen no ha podido ser introducido o deja de ser activado, el resultado podría ser peor de lo que habría sido sin la transferencia de genes.

Los problemas derivados de errores causados por la inserción de genes podrían ser graves e incluso mortales. En los peores casos, podrían no ser evidentes hasta mucho después de que el niño hubiera nacido, tal vez incluso en la edad adulta, cuando los errores pueden ser transmitidos a las generaciones futuras. Por estas razones, dados los límites de la tecnología actual, la transferencia de genes de la línea germinal sigue siendo considerada éticamente inadmisibles<sup>(9)</sup>.

#### *3.1.1.2. Terapia génica de células somáticas*

Este tipo de terapia va dirigida a modificar la dotación genética de células no germinales, es decir, de las células somáticas o constituyentes del organismo. Por ello la modificación genética no puede transmitirse a la descendencia<sup>(10)</sup>.

---

Por consenso general entre los investigadores y con la legislación actual, basada en motivos éticos y de seguridad, solamente se llevan a cabo protocolos clínicos con este tipo de terapia. En principio la terapia génica somática no ha sido motivo de reservas éticas, salvo las relacionadas con su posible aplicación a la ingeniería genética de potenciación, es decir, toda manipulación genética cuyo principal objetivo sea potenciar algún carácter físico, como la altura, sin pretender tratar alguna enfermedad <sup>(11)</sup>.

La terapia génica somática se divide en 4 niveles:

- a) Terapia génica con integración, en la que el gen es incorporado al ADN.
- b) Terapia génica sin integración, en la que el gen no se incorpora al ADN.
- c) Empleo de pequeños oligonucleótidos sintéticos, también denominados moléculas ribozima/antisentido, sin elementos regulatorios que modifiquen la expresión génica.
- d) Vacunas ADN terapéuticas.

Algunas preocupaciones planteadas acerca de la transferencia de genes somáticos están relacionadas con la posibilidad de que, inadvertidamente, pudiera dar lugar a la transferencia de genes de la línea germinal. Siempre es posible que un vector pueda introducir el gen en una célula que no sea aquella para la que supone que debe ser objetivo (por ejemplo, una célula espermática). También podría suceder que, a través de un mecanismo secundario, el nuevo gen accediera a ciertas células diana mediante el proceso natural independiente, como es la transfección, es decir, transferir el gen a una célula de la línea germinal.

Por otra parte, si la transferencia génica somática se realizara en el útero, en especial antes del segundo trimestre, aumentaría la probabilidad de que algunas células en las que el gen es absorbido se convirtieran en parte de la línea germinal. Es posible que, para tratar eficazmente ciertas enfermedades mediante la transferencia de genes, pueda llegar a ser necesario aplicar técnicas somáticas en el

desarrollo temprano, de modo que, en este caso la transferencia de la línea germinal sería inevitable.

La terapia génica somática ha centrado sus actuaciones sobre enfermedades hereditarias bien definidas cuyo defecto genético reside en un único gen, las llamadas enfermedades monogénicas. Estas podrían ser del tipo de las hemofilias, fenilcetonuria, deficiencia de adenosina deaminasa, fibrosis quística, distrofia muscular, hipercolesterolemia familiar, etc.

Las enfermedades monogénicas son enfermedades hereditarias cuyo defecto genético es fácilmente reconocible en los portadores y altera el funcionamiento de un tipo celular en concreto, más o menos accesible a los genes terapéuticos externos.

Las enfermedades provocadas por la alteración de más de un gen, o por falta de coordinación de varios genes, llamadas poligénicas, son lógicamente más complejas de abordar <sup>(12)</sup>.

Hasta agosto de 2016 se habían puesto en marcha un total de 2.409 ensayos clínicos de terapia génica, de estos el 64,8% se realizan en América y un 23,6% en Europa (figura 1). La mayor parte de estos protocolos se encuentran en fase 1 y están enfocados al tratamiento del cáncer (Figura 2 y 3)<sup>(13)</sup>.

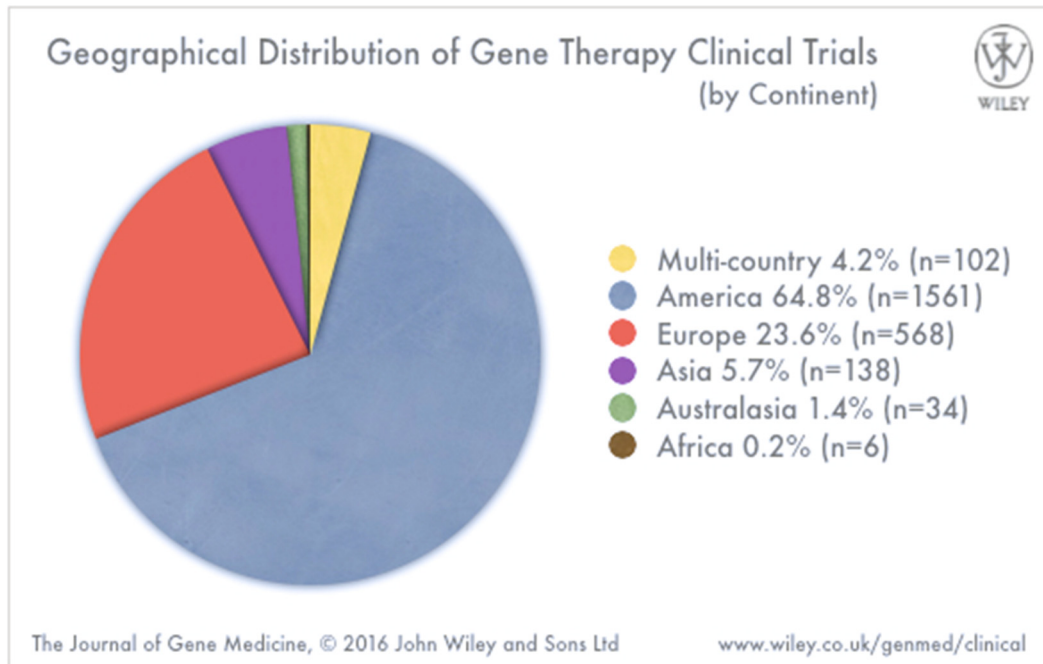


Figura 1.- Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según continentes.  
<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

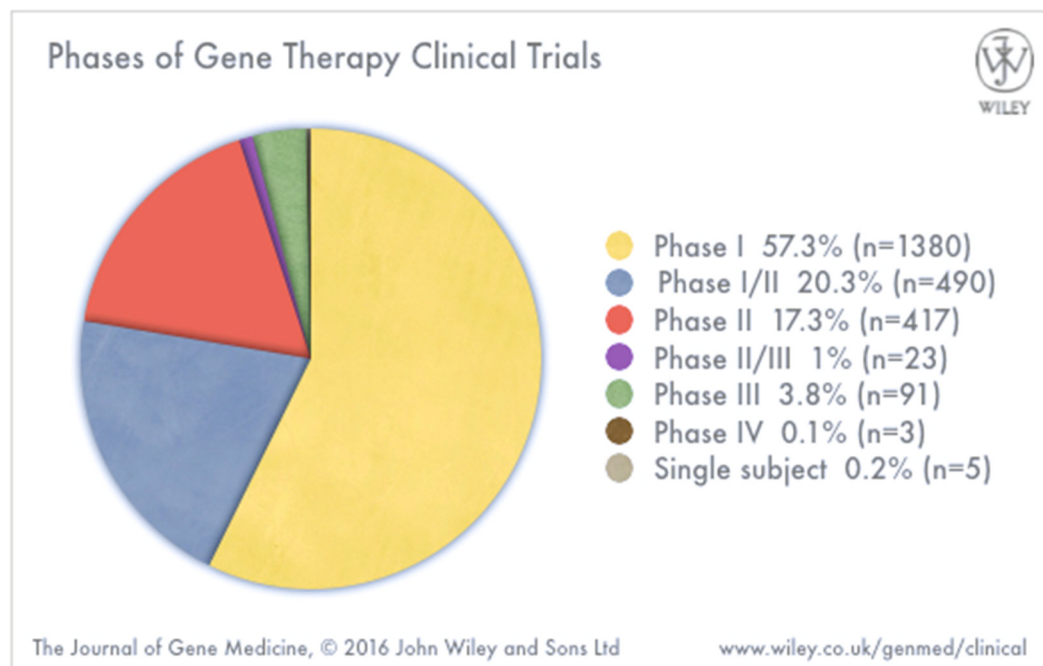


Figura 2.- Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según la fase en que se encuentran.



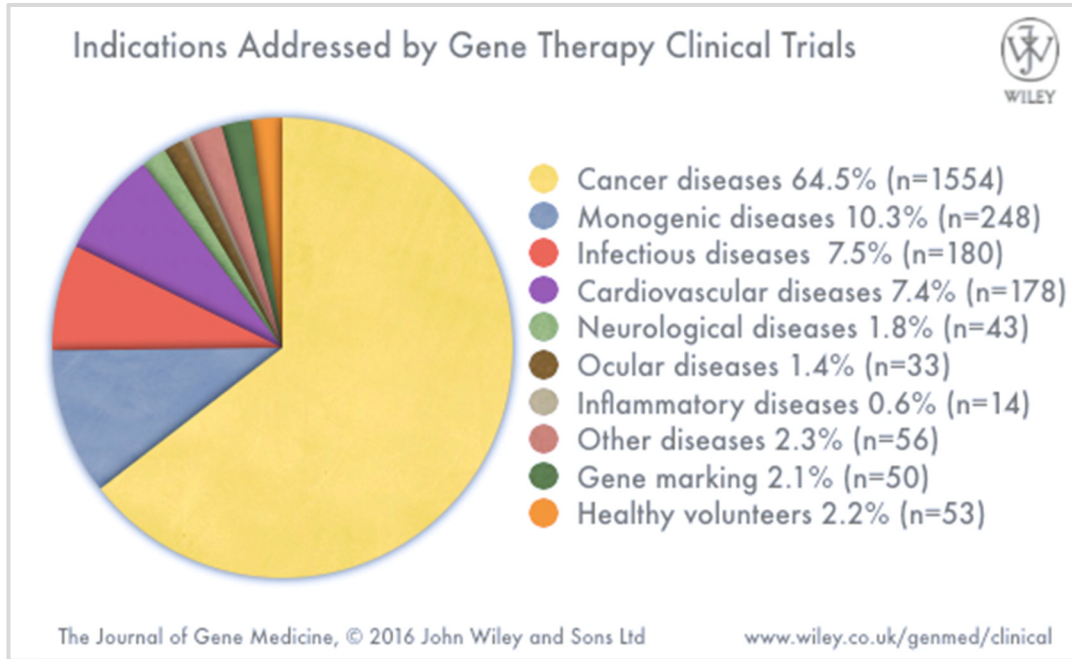


Figura 3.- Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según el tipo de enfermedad a los que están enfocados

---

## 3.2. TRANSFERENCIA GÉNICA

La terapia génica requiere que se transfieran eficazmente los genes clonados a células defectuosas, de manera que los genes introducidos sean expresados en cantidad adecuada. La introducción del gen dentro de la célula se denomina transferencia génica, transducción o transfección. Para introducir un gen en el interior de una célula se requiere un vector, un vehículo que facilite la entrada del ADN dentro del tejido afectado <sup>(14)</sup>. El vector es una molécula transportadora del gen.

Las características de un vector ideal son las siguientes:

- Debe ser muy específico, y capaz de suministrar de manera eficiente uno o más genes, que deben ser reconocidos por el sistema inmune para no ser eliminados en altas concentraciones por el organismo.
- Una vez que el vector se inserta en el tejido no debe inducir una reacción alérgica o inflamatoria.
- Debe ser seguro no sólo para el paciente sino también para el medio ambiente.
- El vector debe ser capaz de expresar el gen durante el tiempo requerido para solucionar el defecto genético, en ocasiones, a lo largo de la vida de la célula.

### 3.2.1. Tipos de genes integrados

Tras la transferencia génica, los genes insertados pueden llegar a integrarse en los cromosomas de las células, o bien quedar como elementos genéticos extracromosómicos, a los que se denomina episomas <sup>(15)</sup>. Las características de los distintos tipos de genes son:

a) **Genes integrados en cromosomas**

La ventaja de que el gen se integre en el cromosoma es que puede perpetuarse por replicación cromosómica tras la división celular, con lo que tendríamos como resultado a largo plazo una expresión estable de dicho gen. Así, en los tejidos formados por células en división activa, la clave es dirigir la modificación a las células madre, ya que la transferencia eficiente de genes a células madre asociada a la expresión estable del gen ofrece la posibilidad de curar un trastorno genético.

La integración cromosómica tiene inconvenientes debido a que la inserción del gen suele ocurrir casi al azar. En algunos casos los genes insertados pueden no expresarse debido a su inclusión en regiones muy condensadas. En ocasiones, la integración puede provocar la muerte celular del huésped.

Una preocupación mayor es el riesgo de cáncer, dado que la integración puede perturbar los patrones normales de expresión de genes que controlan la división o la proliferación celular, por ejemplo, a través de la activación de un oncogén o de la inactivación de un gen supresor de tumores o de un gen implicado en la apoptosis.

---

### b) **Genes no integrados en cromosomas o episomas**

En algunos casos los sistemas de transferencia génica están diseñados para insertar genes en células donde pueden quedar como elementos extracromosómicos y tener una expresión elevada. Si las células se encuentran en una fase de división activa, el gen introducido puede no segregarse igualmente a las células hijas, por lo que su expresión a largo plazo se vería comprometida. En esta situación, la posibilidad de curar un trastorno genético es remota, ya que serían necesarias sesiones repetidas de terapia génica.

Existen enfermedades en las que la expresión del gen a largo plazo no es necesaria, como en las terapias génicas contra el cáncer, en las que la intención es eliminar la expresión del gen causante sin necesidad de repetir esta función en el futuro.

### 3.2.2. Métodos de transferencia génica

Para alcanzar un determinado efecto con la terapia génica es necesario introducir de manera eficaz la secuencia génica de interés en el interior de la célula diana. El problema de cómo hacer llegar un gen terapéutico a una célula diana deficitaria de esa función es el mayor obstáculo de la transferencia génica.

Dos técnicas se han utilizado para realizar la entrega de vectores: la terapia *in vivo* y la terapia *ex vivo* <sup>(16)</sup>.

#### a) **Terapia génica *in vivo***

Consiste en introducir el vector con el gen terapéutico directamente en las células del paciente, vía sistémica por infusión o bien por inyección directa en el tejido infectado. La principal ventaja es su sencillez, pero el principal inconveniente es que no se pueden distinguir las células que adquieren el gen terapéutico de las que no lo reciben. Por tanto, la transferencia génica por vía sistémica requiere especificidad tisular, es decir, un vector dirigido

que sea capaz de reconocer el tejido diana para evitar que las células sanas sean también transferidas con el gen terapéutico <sup>(17)</sup>.

**b) Terapia génica ex vivo**

Consiste en aislar las células afectadas, cultivarlas in vivo en el laboratorio y someterlas al proceso de transferencia génica; una vez transformadas las células, con el gen terapéutico integrado, se vuelven a implantar al individuo. Este método tiene la ventaja de que solamente se exponen a la transferencia del gen terapéutico las células afectadas, se mantiene un estrecho control sobre todo el proceso y se consigue una mayor eficacia de la transducción genética <sup>(18)</sup>.

Es un procedimiento más complejo y más costoso y no se puede aplicar en aquellos tejidos no son susceptibles de crecer en cultivo <sup>(19)</sup>.

### 3.2.3. Vectores utilizados para la transferencia génica

Los vectores utilizados actualmente se pueden dividir en dos grandes grupos: fisicoquímicos o no virales y virales. Los fisicoquímicos a su vez se pueden dividir en físicos y químicos. La terapia génica, por tanto, se puede clasificar en terapia génica viral y terapia génica no viral.

#### *3.2.3.1. Vectores fisicoquímicos o no virales*

Fueron los primeros en ser desarrollados y en ellos el ADN foráneo o exógeno está integrado en un plásmido (molécula de ADN que puede ser mantenida de manera episómica, es decir, de forma estable e independiente del genoma de la célula del huésped). La terapia génica no viral consiste en la entrega de ADN a través de un vector no viral, utilizando procedimientos físicos o químicos <sup>(20)</sup>.

Los vectores fisicoquímicos o no virales se han desarrollado como una alternativa a los sistemas basados en virus. Estos se dividen en dos categorías: físicos y químicos. La microinyección, electroporación, los microproyectiles, los métodos de ultrasonido, y los sistemas hidrodinámicos son los métodos físicos más utilizados,

---

e implican el uso de la fuerza física para aumentar la permeabilidad de la membrana celular y permitir que el gen entre en la célula. La principal ventaja de los métodos físicos es que son fáciles de usar. Sin embargo, también tienen la desventaja de que pueden causar daños en los tejidos por su propio mecanismo de acción.

Los métodos químicos implican el uso de transportadores preparados a partir de compuestos sintéticos o naturales para la entrega de genes en la célula, incluyendo polímeros sintéticos y naturales, los liposomas, dendrímeros, proteínas sintéticas, y los lípidos catiónicos.

Se debe superar un gran número de barreras con el fin de aumentar la eficacia de los vectores no virales en los seres humanos. Estas barreras se clasifican en extracelulares e intracelulares <sup>(21)</sup>. La membrana celular es una barrera anatómica que impide el transporte directo de macromoléculas a las células diana a través del epitelio. Por otra parte, en el espacio extracelular están los fagocitos, macrófagos y otras células que son responsables de la limpieza de partículas coloidales cargadas de ADN en la circulación sanguínea. Teóricamente los ácidos nucleicos desnudos por sí solos no pueden atravesar la membrana celular y necesitan de mecanismos de absorción celular, tales como la endocitosis, la pinocitosis o la fagocitosis o de un mecanismo físico o químico <sup>(22)</sup>.

Un sistema ideal de transporte de genes debe cumplir, al menos tres criterios<sup>(23)</sup>:

- Debe llevar el gen a través de la membrana plasmática al núcleo de la célula diana.
- Debe proteger el gen de enzimas intracelulares
- No debe causar ningún efecto tóxico.

Las tres principales ventajas de estos sistemas es que son de baja inmunogenicidad y baja toxicidad y su producción a gran escala es fácil. Los vectores

no virales deben ser diseñados de acuerdo a la orientación específica de la célula, la captación y la liberación celular.

Algunas alternativas físicas para la internalización de los vectores no virales en de la célula son las siguientes <sup>(24)</sup>:

- a) **Microinyección:** el mecanismo de entrega de genes implica la penetración de una aguja rompiendo la membrana celular y permitiendo que el ADN del plásmido entre en la célula; como consecuencia de esto, siempre se dañan los tejidos y el suministro de ADN es limitado (Figura 4). Este procedimiento estuvo inspirado en el éxito de la entrega de genes a las células musculares a través de la inyección directa de ADN del plásmido en el músculo de ratones <sup>(25)</sup>. Un procedimiento similar también se realizó en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, basado en la inyección intratumoral de ADN del plásmido que contiene el gen p53, también llamado gen guardián del genoma <sup>(26)</sup>.

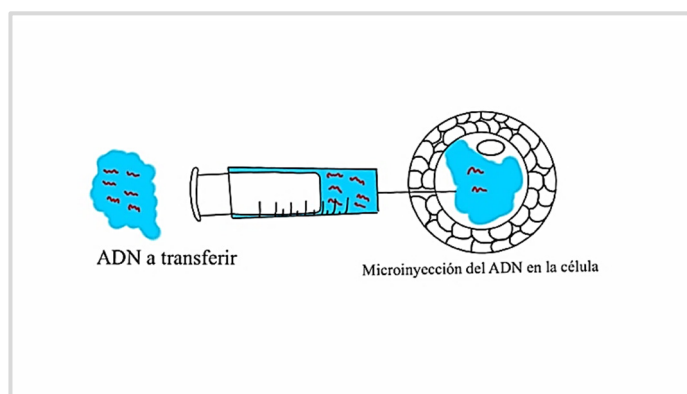


Figura 4.- Mecanismo de microinyección

- b) **Microproyectiles:** consiste en propulsar las partículas recubiertas por ADN contra las células (Figura 5). La transferencia de genes intracelular se consigue mediante el ajuste de la presión de propulsión, tamaño de la partícula, y la distancia entre la pistola de genes y las células diana. N. Yang et al y S. Kuriyama et al <sup>(27,28)</sup>, en el año 2000, demostraron en ratones que mediante esta técnica se puede realizar la transferencia génica a las células hepáticas. Sin embargo, la técnica cuenta con algunas

limitaciones ya que requiere de un procedimiento quirúrgico para la exposición del hígado. Estos autores hallaron expresión de genes únicamente en las células próximas a la superficie exterior de la zona objetivo.

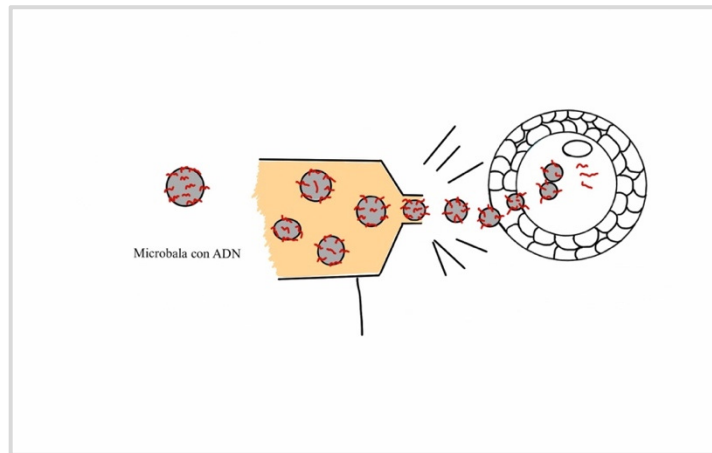


Figura 5.- Mecanismo de microproyectiles

- c) **Electroporación:** consiste en incrementar la permeabilidad de la membrana celular a través de impulsos eléctricos (Figura 6). La eficiencia de la entrega se determina por la intensidad del pulso, la duración y la frecuencia <sup>(29)</sup>. Inicialmente fue utilizado para la transferencia de genes de células de mamífero por Neuman et al en 1982 <sup>(30)</sup>, y se ha estudiado ampliamente en los últimos años como un método eficaz para el suministro de genes no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Usando este método R. Heller et al, T. Suzuki et al y F. Lui et al. llegaron a la conclusión de que el mayor inconveniente de la transferencia de genes mediada por electroporación de las células del hígado *in vivo* nuevamente es la necesidad de un procedimiento quirúrgico para exponer y permitir la inserción de electrodos en el hígado o la colocación de la placa en la superficie del hígado. Además, el área de impacto de cada procedimiento es bastante limitado. Aunque es eficaz en aumentar el número de células transfectadas, la alta tensión de los impulsos eléctricos a menudo resulta en un daño tisular significativo <sup>(31-33)</sup>.



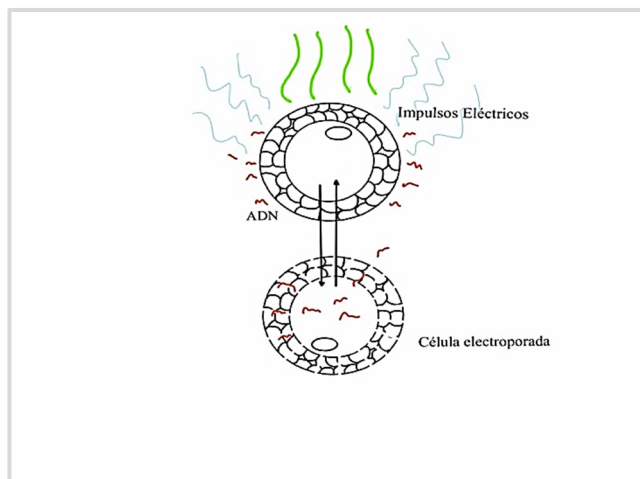


Figura 6.- Mecanismo de electroporación

- d) **Hidrodinámica:** consiste en la inyección intravascular de la solución acuosa, cuando se utiliza con material genético para la transferencia génica se denomina hidrofeción<sup>(34)</sup>. Este mecanismo depende de las propiedades de los capilares sanguíneos y de las propiedades dinámicas de los fluidos que pasan a través de ellos. La estrecha relación entre los capilares sanguíneos y los fluidos hace que exista un acceso inmediato de ADN a las células del parénquima, una vez rota la barrera endotelial (Figura 7)

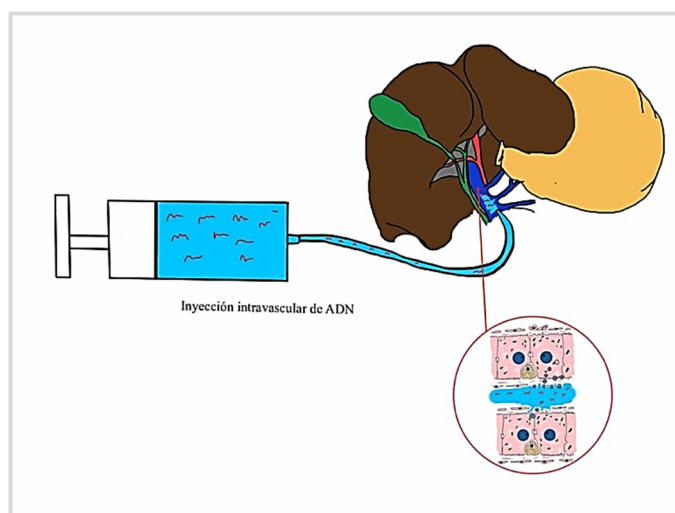


Figura 7.- Inyección hidrodinámica de ADN

La entrega de genes por esta vía utiliza una fuerza hidrodinámica generada por la fuerza de la inyección de un gran volumen de solución de ADN en la sangre con el fin de permeabilizar el endotelio capilar y generar “poros”

---

en la membrana plasmática de las células del parénquima, a través de la cual el ADN u otras macromoléculas de interés pueden llegar al interior de la célula <sup>(35,36)</sup>. Con el tiempo los poros de la membrana se cierran, atrapando a estas moléculas en el interior de la célula. La eficiencia en la entrega de genes del procedimiento hidrodinámico está determinada por la estructura capilar, la arquitectura de las células que rodean el capilar y la fuerza hidrodinámica aplicada al interior de los vasos sanguíneos.

En el año 1999, Y. Lui y G. Zhang informaron del procedimiento tras realizar la inyección rápida de un gran volumen de solución de ADN a través de la vena de la cola del ratón. El método consiste en una inyección durante 5-8 segundos del 8-10% del peso corporal en volumen de solución isotónica de ADN en la vena de la cola de un ratón <sup>(35)</sup>.

El mecanismo de acción que subyace a este procedimiento incluye:

- a. Inducción de la congestión cardíaca y elevación de la presión en la vena cava inferior.
- b. Flujo retrogrado de la solución de ADN en el hígado.
- c. Ensanchamiento transitorio de las fenestraciones de la membrana del hepatocito.
- d. Transferencia de genes a los hepatocitos.

T. Suda et al, han demostrado que el impacto hidrodinámico en el hígado es transitorio y reversible. El proceso por el cual la membrana plasmática del hepatocito vuelve a su estructura normal dura menos de un minuto. Debido a su simplicidad, alta eficiencia y reproductibilidad, la entrega hidrodinámica se ha convertido en el método de rutina para la entrega de ADN, ARN, proteínas, compuestos pequeños e incluso vectores virales en los hepatocitos *in vivo* <sup>(37)</sup>.

Desde su desarrollo en 1999, este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para la expresión génica y el establecimiento de los modelos de enfermedad en animales de investigación.

Las principales ventajas de los vectores fisicoquímicos son su sencillez en la preparación, la ausencia de limitaciones en cuanto al tamaño del ADN que puedan transferir, su escasa toxicidad y escasa inmunogenicidad. Sus inconvenientes son su baja eficacia de transducción a las células diana y el hecho de que algunos de ellos solo pueden utilizarse *in vivo*.

Los vectores químicos pueden dividirse en partículas inorgánicas o materiales sintéticos/biodegradables. Las alternativas químicas para la internalización de los vectores no virales dentro de la célula más desarrolladas son las siguientes:

a) **Partículas inorgánicas**

Por lo general son nanopartículas que pueden ser fabricadas en diferentes tamaños, formas y porosidad con el fin de escapar del sistema retículo endotelial o para evitar la degradación. El sulfato de calcio, sílice, oro y compuestos magnéticos son algunas de estas partículas.

b) **Partículas sintéticas biodegradables**

— *Lípidos catiónicos*: cientos de lípidos se han desarrollado para la transferencia génica. Todos ellos comparten estructuras comunes de cabeza hidrófila con carga positiva y una cola hidrófoba con una estructura que enlaza ambos. El objetivo de la terapia génica basada en el lípido catiónico es el transporte de ADN de plásmido a la célula para lograr la transcripción y la traducción. Las desventajas más importantes de los lípidos catiónicos son la inestabilidad y heterogeneidad estructural, la inactivación en la sangre y la poca eficacia hacia el objetivo en comparación con otros sistemas <sup>(38)</sup>. Existen diferentes modalidades de lípidos catiónicos, entre los que

---

destacan los nanolípidos en emulsión y las nanopartículas de lípidos enteros.

- Vectores basados en péptidos: considerados superiores a otros sistemas de vectores no virales por su seguridad en la protección del ADN, y en cuanto a la especificidad para llegar al objetivo celular, atravesar la membrana y entregar el material genético en el núcleo <sup>(39)</sup>.
- Vectores basados en polímeros: son estructuras de cadena larga compuestas de moléculas pequeñas llamadas monómeros unidos. Los polímeros que se componen de un monómero repetido, se llaman homopolímeros, mientras que los compuestos por dos monómeros se denominan copolímeros. Existen polímeros naturales y sintéticos y se utilizan en la administración de fármacos <sup>(40)</sup>.

### 3.2.3.2. *Vectores virales*

Constituyen la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos al interior de las células diana y son los vectores más utilizados en terapia génica. La entrada de ADN o ARN en la célula huésped es un mecanismo común en el ciclo vital de los virus. Por ello, los virus son excelentes candidatos para ser utilizados como vectores. Los más destacados son los retrovirus, los adenovirus y los virus adenoasociados.

Los vectores virales se obtienen por eliminación de uno o más genes indispensables para la replicación del virus y su sustitución por el gen terapéutico. De esta forma el nuevo virus es defectuoso, lo que implica que tiene la capacidad de infectar a las células, pero es incapaz de multiplicarse en ellas, dando lugar a un vector recombinante relativamente seguro y con capacidad infectiva intacta. Los vectores virales poseen una elevada eficacia de transferencia <sup>(41)</sup>, su administración puede ser sistémica puesto que la estructura del gen lo protege de posibles factores adversos del torrente sanguíneo, permite diseñar terapias permanentes o temporales dependiendo del virus utilizado (si se integra o no al genoma del huésped, como por el ejemplo los

retrovirus) y por último, también pueden seleccionar en algunos casos el tipo celular diana debido a que algunos virus presentan tropismos específicos.

Sin embargo, plantean algunos inconvenientes como la relación entre el tamaño del virus y el de las secuencias génicas a insertar, la seguridad en la transferencia por la posibilidad de transmisión de forma involuntaria del virus nativo patógeno y la reacción inmunitaria que el organismo receptor pone en marcha, pudiendo eliminar el material genético a través de la muerte de las células genéticamente alteradas<sup>(42)</sup>. En la tabla 1 se representan los distintos tipos de vectores virales con sus respectivas características.

	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	Virus Adeno- asociados
Material genético	ARN	ARN	dsADN	ADN
Capacidad de carga	8 kb	8 kb	35 kb	5-9 kb
Forma de acción del vector	Integrado	Integrado	Episomal	Episomal e Integrado
Ventajas	Alta eficiencia de integración. No respuesta inmune. Largo periodo de expresión.	Largo periodo de expresión. Células que no se dividen. Gran capacidad de clonación.	Altos niveles de transducción. Largo periodo de expresión. Células que no se dividen.	Células que no se dividen. Largo periodo de expresión.
Desventajas	Transducción sólo en células que se dividen. Carcinogénesis insercional.	Integración en genes activos.	Toxicidad aguda.	Capacidad limitada de clonación. Reacción inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.

Tabla 1.- Vectores virales más utilizados

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 de transportar genes de gran tamaño y expresarlos transitoriamente, y los retrovirus por su capacidad de insertar el gen en el genoma de la célula huésped.

En la figura 8 se muestran los diferentes vectores tanto virales como no virales, empleados en ensayos clínicos de terapia génica aprobados entre los años 1989 y 2014.

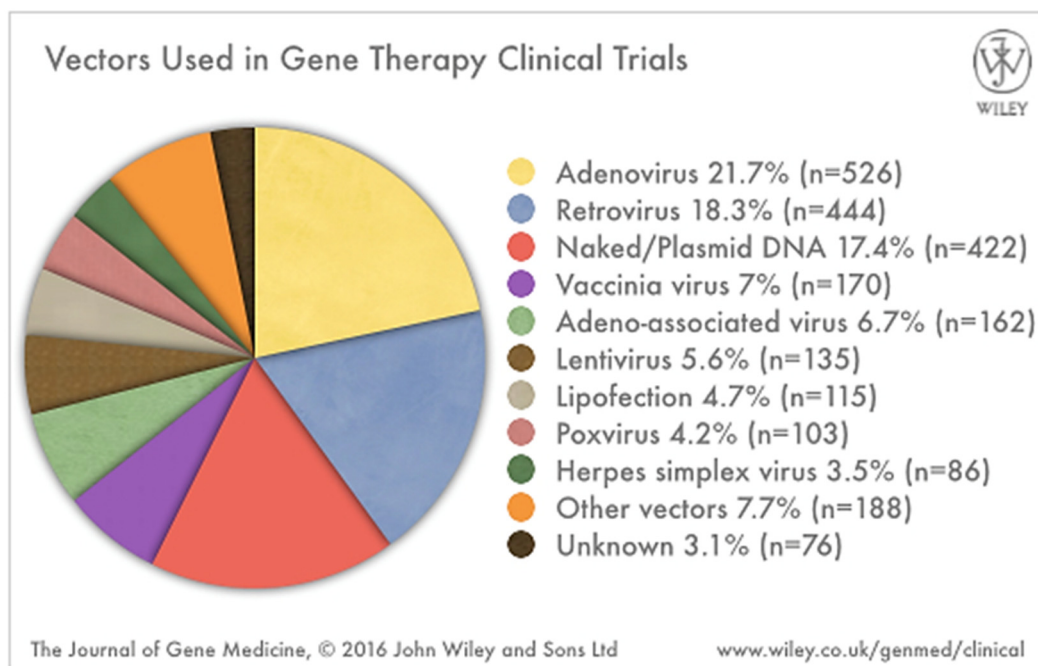


Figura 8.- Vectores empleados en terapia génica. Ensayos clínicos 1989-2016. Fuente: [www.wiley.co.uk/genomed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genomed/clinical)

### 3.3. APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA

La terapia génica implica la manipulación genética del organismo y por tanto, podría ser utilizada, en principio, en cualquier enfermedad cuyo origen se encuentre en la modificación de un factor genético, ya sea de tipo heredado, como las enfermedades monogénicas con patrón de herencia (hipercolesterolemia familiar, fibrosis quística, hemofilia A), las enfermedades con herencia multifactorial (hipertensión arterial, diabetes y enfermedad coronaria) o de tipo adquirido (cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, artritis).

También podría utilizarse en la mejora de los procesos de curación y regeneración tisular, y en el tratamiento de enfermedades neurológicas degenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer <sup>(43-45)</sup>.

En cada grupo de enfermedades anteriormente mencionadas se están llevando a cabo numerosos experimentos en animales (fase preclínica) y estudios clínicos que arrojan resultados prometedores, anunciando así una verdadera era de la terapéutica génica.

#### 3.3.1. Enfermedades monogénicas

Inicialmente, la terapia génica fue ideada como una forma de tratamiento para las enfermedades genéticas causadas por mutación de un solo gen (monogénicas).

Entre las enfermedades hereditarias existen trastornos de muy diversa índole, en los que un gen defectuoso determina que no se sintetice una proteína específica, o bien que se elabore una proteína anormal <sup>(46)</sup>. En ambos casos, la ausencia de proteína normal puede ocasionar diversas manifestaciones clínicas, según la función estructural o enzimática que normalmente ejerza dicha proteína. Esta es la razón por la que los cuadros clínicos pueden presentarse en un amplio espectro de situaciones, desde leves y que no necesitan tratamiento (como el daltonismo), hasta enfermedades graves (como la fibrosis quística o hemofilia). En términos generales se trata de enfermedades en las que la farmacoterapia convencional resulta poco eficaz.

Enfermedad	Enzima alterada
Inmunodeficiencia combinada grave	Adenosina desaminasa
Enfisema	$\alpha$ -1-antitripsina
Citrulinemia	Arginosuccinato sintetasa
Deficiencia de adhesión leucocitaria	CD 18
Fibrosis quística	CFTR
Hemofilia A	Factor VIII
Hemofilia B	Factor IX
Talasemia	$\beta$ -globina
Anemia falciforme	$\beta$ -globina
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Mucopolisacaridosis tipo I	$\alpha$ -L-iduronidasa
Mucopolisacaridosis tipo IV	$\beta$ -glucuronidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa
Hipercolesterolemia familiar	Receptor LDL
Hiperamonemia	Ornitina transcarbamilasa
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Distrofia muscular de Duchenne	Distrofina

Tabla 2.- Enfermedades monogénicas tratadas con terapia génica

En pocas enfermedades de origen genético es factible suministrar la proteína deficitaria en una forma farmacéutica efectiva, dada su naturaleza lábil y compleja, y la necesidad de hacerla llegar a un dominio celular específico (Tabla 2). En ciertos casos se recurre a trasplantar el órgano afecto, pero esta técnica también tiene limitaciones importantes, como la disponibilidad de órganos y las consecuencias adversa que provienen de la inmunosupresión requerida para evitar el rechazo del órgano

El problema podría resolverse si se suministrara una copia normal del gen defectuoso a los tejidos u órganos afectados; así, la proteína podría ser sintetizada dentro de las células utilizando las vías celulares habituales. Debemos tener en cuenta que cuando existe un gen defectuoso, éste se encuentra en todas las células de la persona



afectada por el trastorno hereditario. El limitado número de tejidos implicados en la mayoría de los trastornos hereditarios (ya que las anomalías graves con múltiples alteraciones suelen ser incompatibles con la vida) simplifica las exigencias de la terapia génica, puesto que únicamente será necesario introducir una copia funcional del gen en aquellos tejidos que realmente lo requieran. Si puede mantenerse la adecuada expresión del gen durante un periodo de tiempo prolongado, la enfermedad podría ser curada o, cuanto menos, paliada <sup>(47,48)</sup>.

Los criterios para seleccionar una enfermedad humana candidata al tratamiento mediante terapia génica son:

- a) La enfermedad ha de amenazar gravemente la vida del paciente.
- b) Los órganos, tejidos y tipos celulares afectados por la enfermedad han de estar bien caracterizados.
- c) El gen normal ha de poder ser introducido en una fracción significativa de las células del tejido afectado.
- d) El gen debe poderse expresar adecuadamente, generando una cantidad suficiente de proteína normal.

### 3.3.2. Cáncer y terapia génica

El cáncer es un problema sanitario de gran relevancia, constituyendo una importante causa de mortalidad en todos los países occidentales. En España representa la segunda causa de muerte en la población general después de las enfermedades cardiovasculares <sup>(49)</sup>. Hoy en día, el pronóstico de los enfermos con cáncer ha mejorado, aunque se cree que en los próximos años aumentará la mortalidad debido al incremento de la incidencia de la enfermedad.

Existe en la actualidad un gran interés en desarrollar nuevas estrategias de tratamiento aprovechando los avances considerables en el conocimiento de la biología molecular en relación con el cáncer. Ello conlleva que se estén realizando

---

un gran número de ensayos clínicos para el estudio de dicha patología. Casi el 70% de los estudios clínicos para la terapia génica están dirigidos contra el cáncer en casi todos los órganos <sup>(50)</sup>.

Las células cancerosas presentan un patrón de crecimiento anormal, en el que la regulación de su crecimiento y maduración están fuera de control. Es un proceso en el que están implicadas mutaciones en los genes que codifican las moléculas que regulan el crecimiento celular, la muerte celular y la reparación del ADN.

Se han descrito tres tipos de genes alterados en las células cancerosas:

- a) Oncogenes, que normalmente estimulan el crecimiento celular y se encuentran sobreactivados.
- b) Genes supresores de tumores, que inhiben el crecimiento de las células y en las células cancerosas están inactivados.
- c) Genes que contribuyen a la reparación del ADN, que pueden estar mutados en células cancerosas.

Estas características suelen ser las dianas para el desarrollo de terapias que eliminen las células tumorales, mejoren la respuesta inmune o bloqueen la proliferación tumoral. Con todo este conocimiento de la biología molecular de las células cancerígenas se han intentado distintos tipos de estrategias para el tratamiento del cáncer. Así, existen ensayos clínicos cuyo objetivo es corregir defectos genéticos de células, introduciendo genes en células cancerosas que están inactivadas o suprimiendo la función de los genes que están sobreactivados. Por ejemplo, produciendo la inactivación de oncogenes mutados, como el *ras*, o generando la reexpresión de antioncogenes o genes supresores de tumor inactivos como el p53 <sup>(51)</sup>. También se ha desarrollado la terapia génica consistente en aumentar la eficacia de los fármacos antitumorales mediante el aumento de la toxicidad selectiva en el interior de las células cancerígenas<sup>(52)</sup>. Otra estrategia consiste en proteger las células

del organismo que presentan mayor sensibilidad a los venenos celulares, por ejemplo, las células sanguíneas.

Según las características descritas existen diferentes tipos de terapias desarrolladas para el tratamiento del cáncer y terapia génica:

a) **Terapia por compensación de mutaciones**

En vista de que la mayoría de mutaciones que conllevan al desarrollo tumoral afectan a protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN<sup>(53)</sup>, el restablecimiento de su función normal puede ser diana de una terapia génica contra el cáncer. Por ejemplo, el gen p53, se encuentra mutado en más del 50% de tumores, y su expresión normal puede restablecerse mediante un adenovirus que codifique la copia nativa del mismo (Ad-p53)<sup>(54-56)</sup>.

En el cáncer de próstata y de cuello uterino, Ad-p53 inhibe el crecimiento tumoral in vitro e in vivo, y en el osteosarcoma, incrementa la sensibilidad al cisplatino y la doxorubicina<sup>(57)</sup>.

Un ensayo preclínico en el cáncer de pulmón demuestra que Ad-p53 induce la regresión tumoral con una toxicidad aceptable cuando se usa solo o en combinación con radioterapia y/o quimioterapia<sup>(58)</sup>, y en carcinoma hepático, Ad-p53 combinado con TRAIL exógeno (proteína celular que se puede unir a ciertas moléculas de algunas células cancerosas y puede destruir las células) incrementa la muerte celular por apoptosis<sup>(59)</sup>, lo que demuestra que Ad-p53 ejerce un efecto antitumoral sinérgico al administrarse combinado con los tratamientos tradicionales de quimio/radioterapia o con nuevos medicamentos antitumorales. Debido a los efectos antitumorales obtenidos y al buen perfil de seguridad con estos vectores, se han llevado a cabo más de 100 ensayos clínicos utilizando Ad-p53.

---

La primera marca de terapia génica utilizando Ad-p53 se aprobó en octubre de 2003 contra el cáncer de cabeza y cuello y se llamó Gendicine®. Posteriormente se aprobó Oncorine®, contra el carcinoma nasofaríngeo<sup>(60)</sup>. Ambos vectores demostraron un efecto sinérgico antitumoral en combinación con radioterapia, quimioterapia, cirugía o hipertermia. Posteriormente se patentó Advexin®, similar a Gendicine®, cuya patente abarca cualquier adenovirus que porte p53 bajo control de cualquier promotor<sup>(61)</sup>.

En noviembre de 2012 en Europa se aprobó y comercializó el primer tratamiento de terapia génica, el Glybera®, que es un virus adenoasociado que sintetiza la lipoproteína lipasa (LPL) y se usa para el tratamiento de los pacientes que sufren deficiencia de la lipoproteína lipasa, enfermedad de tipo autosómica recesiva en la que el metabolismo de las grasas se encuentra alterado ocasionando hipertrigliceridemia, pancreatitis, etc.<sup>(62,63)</sup>.

#### **b) Terapia génica suicida**

La terapia génica suicida incrementa la susceptibilidad del tumor a la quimioterapia mediante la expresión de un gen suicida que codifica una enzima capaz de catalizar la conversión de un profármaco no tóxico en un metabolito tóxico potente de corta duración, con capacidad para difundirse desde la célula tumoral en la que se produce y eliminar las células tumorales que la rodean tras la administración del fármaco, sin entrar en la circulación sistémica ni causar efectos secundarios<sup>(53)</sup>.

Los sistemas suicidas (enzima/profármaco) más utilizados son: el gen de la timidina-cinasa del virus Herpes simple (HSV-tk) (gen suicida), y como profármaco el ganciclovir (GCV), cuyo metabolito tóxico es el deoxi-timidina trifosfonato, un análogo de la purina que inhibe la ADN polimerasa e induce a la apoptosis como resultado del secuestro celular, y el gen de la citosina desaminasa (CD) de *Echerichia coli* (gen suicida), y

la 5-fluorocitosina (5-FC) como profármaco, cuyo metabolito tóxico es el 5-fluorouracilo<sup>(64)</sup>. Se han desarrollado nuevos sistemas suicidas como el basado en el gen del citocromo P450 (gen suicida) y ciclofosfamida o isofosfamida como profármacos cuya actividad antitumoral se potencia con la transferencia del gen del citocromo P450<sup>(65)</sup>.

Numerosos ensayos preclínicos para el tratamiento del glioma<sup>(66)</sup>, cáncer de vejiga<sup>(67)</sup>, colon<sup>(68)</sup>, estómago<sup>(69)</sup> y pulmón<sup>(70)</sup>, utilizando el sistema HSV-tk-GCV, han arrojado resultados prometedores para ser aplicados a la clínica<sup>(61)</sup>. En glioma de alto grado operable, se incrementó significativamente la supervivencia, y debido a que la citotoxicidad de este tratamiento en células normales es muy baja, se ha sugerido su posible utilización como tratamiento primario o adyuvante<sup>(71)</sup>.

**c) Lisis de células tumorales utilizando adenovirus de replicación selectiva**

Los adenovirus son seguros, fáciles de manipular genéticamente y poseen un ciclo de vida lítico, por lo cual, se han desarrollado variantes virales incapaces de replicarse en las células normales pero capaces de infectar y lisar efectivamente células tumorales. El virus lítico se replica en su interior hasta que lisa la célula con el fin de liberar nuevas partículas virales que infectan las células tumorales vecinas, perpetuando así los ciclos de infección, replicación y lisis mientras existan células tumorales que soporten la infección<sup>(72)</sup>.

Estos adenovirus actúan como un agente biológico antitumoral más que como vehículo para administrar genes terapéuticos, sin embargo, su efecto puede mejorarse al insertar genes de citosinas o enzimas.

Se han desarrollado adenovirus de replicación selectiva, mediante la depleción de funciones virales no necesarias en las células tumorales y la substitución de promotores virales por promotores selectivos del tumor

---

como la alfa-fetoproteína, el antígeno prostático específico, la kalikreína, la mucina 1 y la osteocalcina, entre otros<sup>(73)</sup>.

El primer virus de replicación selectiva utilizado en ensayos clínicos aleatorios fue el ONYX-015, que permite la replicación y lisis de células tumorales deficientes en p53. Este vector demostró un nivel de eficacia satisfactorio en modelos preclínicos contra xenoinjertos de carcinoma de ovario humano deficiente de p53. Sin embargo, a pesar de su seguridad, su aplicación en un estudio clínico en mujeres con cáncer de ovario recurrente y refractario al tratamiento no mostró evidencia clara de respuesta clínica o radiológica en ninguna paciente<sup>(74,75)</sup>.

En un estudio en fase II, tras haberse demostrado una modesta actividad antitumoral con el tratamiento oncolítico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello<sup>(76)</sup>, se observó que cuando los pacientes recibieron el tratamiento oncolítico combinado con quimioterapia (cisplatino y 5 fluorouracilo), tuvieron una respuesta completa sin progresión a los 6 meses de seguimiento, mientras que en todos los tratados únicamente con quimioterapia, hubo progresión de enfermedad<sup>(77)</sup>.

La terapia génica suicida es un claro ejemplo de tratamiento neoadyuvante para mejorar la eficacia del tratamiento quimioterápico. Predina et al describieron una terapia génica con el sistema AdV-tk/GCV para el tratamiento neoadyuvante del carcinoma de esófago<sup>(78)</sup>. La combinación de cirugía, quimioterapia y AdV-tk/GCV mejora la supervivencia y disminuye la recurrencia de la enfermedad por efecto citotóxico y el crecimiento del tráfico de células CD8 intratumorales.

En la tabla 3 se muestran ejemplos de ensayos clínicos desarrollados mediante diferentes modalidades de terapia génica exclusiva o en combinación con terapias convencionales.

	Estudio Fase/Estado general	Objetivos	Intervenciones	País	Tipo de cáncer
Oncolisis viral	Terapia génica con ONYX-015 combinado con cisplatino y fluorouracilo en pacientes con cáncer escamocelular de cabeza y cuello avanzado. <i>(Fase I suspendido)</i>	Determinar factibilidad de dosis máxima con ONYX-015 Determinar distribución de ONYX-015 en biopsia tumoral o de mucosa normal. Determinar respuesta a ONYX-015 solo o en combinación con cisplatino y fluorouracilo	Droga: Cisplatino Droga: Fluorouracilo Biológico: ONYX-01	EEUU	Cabeza/cuello Ovario Hígado Páncreas
	Terapia génica con CV787, en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento hormonal. <i>(Fase I-II completo)</i>	Determinar la seguridad, tolerabilidad y dosis máxima de la inyección intravenosa de CG7870 Evaluar tasa y duración de la respuesta, farmacocinética sistémica y respuesta inmune frente al CG7870 en cáncer de próstata resistente a tratamiento hormonal.	Biológico: CG7870 adenovirus citolítico específico (PSA) antígeno específico de la próstata	EEUU	Próstata metastásico
Compensación de mutaciones	Terapia génica con rAd-p53 solo, o combinado con yodo radioactivo o cirugía para cáncer avanzado de tiroides <i>(Fase IV reclutando)</i>	Determinar perfiles de eficacia de la inyección intratumoral de rAd-p53 solo, combinado con yodo radioactivo o con cirugía.	Droga: rAd-p53 Procedimiento: cirugía Radiación: yodo radioactivo pre cirugía.	China	Tiroides avanzado (III-IV)
	Terapia génica con Ad-p53 para el glioma maligno <i>(Fase I completado)</i>	Determinar el efecto biológico molecular de la dosis máxima tolerada y la toxicidad de la administración intratumoral de Adp53 en pacientes con glioma maligno.	Biológico: Ad5CMV-p53 Procedimiento: cirugía convencional	China	Glioma maligno

	Estudio Fase/Estado general	Objetivos	Intervenciones	País	Tipo de cáncer
Terapia génica suicida	Terapia génica suicida con Ad5 y CD/mutTKSR39 rep-ADP, solo o con IMRT para el cáncer de próstata <i>(Fase II/III Activo, no reclutando)</i>	Probar que el tratamiento con adenovirus competentes de replicación más radioterapia logra una mejor respuesta que la obtenida con IMRT sola en pacientes con cáncer de próstata.	Biológico: Ad5 y CD/mutTKSR39 rep-ADP Prodroga: 5-FC y GCV Radiación: IMRT 40x2Gy	EEUU	Próstata
	Terapia génica para el cáncer hepatocelular por inyección intratumoral de pAd-TK99UN <i>(Fase I completado)</i>	Determinar si la activación de la prodroga después de la transferencia génica intratumoral es segura en humanos. Evaluar la inyección intratumoral de adenovirus defectivos de replicación conteniendo el HSVtk en paciente con cáncer de hígado sin posibilidad de tratamiento curativo	Biológico: inyección intratumoral de TK99UN.	España	Hígado

Tabla 3.- Ejemplos de ensayos clínicos realizados con distintos tipos de terapia génica para el cáncer. \*Modificado de: Josefa A. Rodríguez et al Terapia génica para el tratamiento del cáncer. Rev Colomb. Cancerol. 2014; 18(1):27-40



### 3.3.3. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y Terapia génica

El SIDA es la segunda enfermedad que agrupa la mayor cantidad de ensayos clínicos después del cáncer. El objetivo principal de la terapia génica en el SIDA es detener la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) dentro de las células infectadas, además de impedir que el virus infecte las células sanas.

La infección por VIH se considera una enfermedad genética de carácter adquirido, ya que el virus retrotranscribe su ARN genómico e integra el ADN de doble hélice resultante en el cromosoma de la célula del huésped, de modo que es capaz de modular las funciones de la célula para, finalmente, suprimir el sistema inmune. Por ello, la infección por VIH es en la actualidad un claro objetivo de la terapia génica. Se han realizado ya numerosos estudios sobre el tratamiento de la infección por el VIH mediante terapia génica, tanto *in vitro* en diferentes líneas celulares, como *in vivo* en animales de experimentación<sup>(79)</sup>.

Asimismo, en la actualidad se están ensayando diversos protocolos clínicos de terapia génica para el tratamiento del SIDA. Los ensayos clínicos en desarrollo utilizan mayoritariamente técnicas *ex vivo*. La técnica consiste en aislar células del paciente, que se utilizan como vehículos celulares de los genes terapéuticos. Mediante vectores víricos o por inyección directa de ADN, se introduce un gen terapéutico en esas células diana. A continuación, las células transducidas, es decir, aquellas que han incorporado y expresado el transgén, son reintroducidas en el paciente por vía intravenosa. En algunos protocolos las células transducidas, previamente a su administración al paciente, son expandidas en un cultivo celular para aumentar su cantidad.

Los principales métodos o estrategias que utiliza la terapia génica para el SIDA-VIH son:

- 
- La producción de vacunas anti-VIH, mediante la introducción de moléculas del virus con la finalidad de que el sistema inmune sea capaz de reconocer el virus y eliminarlo.
  - La utilización de anticuerpos que actúen intracelularmente y que impidan la incorporación de partículas virales.
  - La terapia con genes suicidas, similar a la utilizada en la terapia del cáncer.
  - La introducción de genes que produzcan ribozimas que degradan el ARN viral.
  - La introducción de genes que produzcan proteínas similares a las virales, pero defectuosas por lo que al integrarse en la estructura ocasionen reacciones que generen un daño en el mecanismo viral.

Existen numerosos problemas que todavía han de ser resueltos antes de que la terapia génica esté disponible y sea eficaz para la erradicación de la infección por VIH. Muchos de esos problemas son genéricos a la terapia génica, pero otros son específicos debido a la complejidad de esta infección <sup>(80)</sup>.

Los principales problemas descritos son:

- a) Los linfocitos CD4 y los CD8, las células diana, representan el ataque más importante de los virus y desempeñan un papel fundamental en la defensa contra el VIH, sin embargo, ambos tienen una vida media limitada en el organismo.
- b) La gran habilidad de mutación del VIH para evitar respuestas neutralizantes.
- c) La necesidad de producción constitutiva de genes virales para aumentar la posibilidad de inhibición antes de la integración del VIH a la célula.

- d) El alto coste asociado con la terapia génica cuestiona la viabilidad económica de este enfoque.

En la actualidad existe un elevado número de protocolos de terapia génica para el tratamiento del VIH<sup>(81)</sup>, por lo que se tiene la esperanza de que a la vista de los resultados obtenidos sea posible emplear este tratamiento antiviral actual. Por el momento, los resultados provienen de estudios en fases tempranas y aún no son aplicables a la clínica.

---

### 3.4. LIMITACIONES ÉTICAS DE LA TERAPIA GÉNICA

La manipulación genética comenzó a ser aplicada en la década de los años setenta, mediante la puesta a punto de la técnica del ADN recombinante. Desde el principio, sus promotores fueron muy conscientes del riesgo que supondría su aplicación discriminada y, por tanto, de la necesidad de controlar su uso mediante criterios éticos y normas jurídicas.

La ética pretende promover la reflexión individual y colectiva con el fin de apoyar la toma de decisiones prudentes. Existe una serie de preocupaciones acerca de la posible práctica de la transferencia de genes de la línea germinal tanto en casos humanos como no humanos. Estas modificaciones en los seres humanos plantean la posibilidad de que se esté modificando no solamente un individuo, sino una gran cantidad de individuos futuros, con la posibilidad que ello conlleva de producir un potencial daño a las personas y tal vez a la humanidad en su conjunto.

La terapia génica somática se presenta como una intervención terapéutica cuyo objetivo es la curación de la enfermedad, como podría serlo cualquier procedimiento terapéutico. Se considera una intervención deseable, puesto que pretende el bienestar personal del paciente, sin dañar su integridad o deteriorar su calidad de vida. Por lo tanto, la terapia génica somática no supondría mayor controversia que la que tiene cualquier procedimiento terapéutico. Además, se trata de una terapia experimental, por lo que pueden aparecer efectos como la falta de control en la expresión de dichos genes o reacciones inmunitarias al producto. Actualmente y con la tecnología disponible, los efectos adversos más perjudiciales provienen de los problemas relacionados con la eficacia, la inmunogenicidad de los vectores virales y la mutagénesis insercional.

En la transferencia de genes de la línea germinal, las personas afectas, es decir, aquellas para las cuales se lleva a cabo el procedimiento, aún no existen, debido a que la alteración genética se observará en sus descendientes y como aún no somos capaces de controlar estos procedimientos y no se puede asegurar que estos cambios

produzcan solo beneficios en la descendencia, se podría provocar, por ejemplo, la activación de oncogenes que se transmitirían a la descendencia. Por lo tanto, los beneficiarios potenciales no están en condiciones de aceptar o rechazar tal procedimiento.

Los cambios transmisibles que se podrían generar a las siguientes generaciones es el motivo principal por el cual la terapia de células germinales ha sido totalmente proscrita por diferentes organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, y el Consejo de Europa<sup>(82,83)</sup>.

Concebida en un principio para tratar enfermedades metabólicas raras, en la actualidad se espera que la terapia génica pueda incidir en la cura de enfermedades como el cáncer, la enfermedad coronaria y otras que hemos mencionado.

---

### 3.5. LEGISLACIÓN SOBRE LA TERAPIA GÉNICA

Debido a los importantes avances tecnológicos y en gran medida también a la importante difusión por parte de los medios de comunicación de estas técnicas en relación con el genoma humano y la toma de conciencia de sus posibles aplicaciones, en los últimos años han ido redactándose normativas, recomendaciones y discusiones doctrinales jurídicas al respecto. La mayor parte de las normas pretenden evitar el “mal uso” o el abuso de estos conocimientos científicos con vulneración de los derechos o bienes jurídicos dignos de protección.

En Estados Unidos está abierto el debate al respecto, ya que hay sectores de la sociedad que consideran que si una modificación genética es beneficiosa, desde el punto de vista terapéutico, no tiene sentido permitirla únicamente en el sujeto individual a la vez que se prohíbe que se repare la afectación genética a sus descendientes.

#### 3.5.1. Consideraciones generales sobre la terapia génica somática

La terapia génica somática, en este momento aún en estado experimental, no parece plantear problemas diferentes de los que presenta un ensayo clínico con productos químicos farmacológicos y, por ello, la legislación general aplicable sería exactamente la misma. Esta postura es similar en todos los países en los que se ha intentado legislar en relación con el genoma humano.

En el caso de España, la terapia génica y la terapia celular somática quedan definidas de acuerdo con la Directiva 2001/83/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001, tras la actualización realizada por la Directiva 2009/120/CE de la Comisión de 14 de septiembre de 2009.

A su vez la ingeniería de tejidos y los medicamentos combinados de terapias avanzadas quedan definidos en esa misma Directiva 2001/83/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, tras la modificación efectuada

en su redacción por el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007.

Asimismo, la Directiva 2001/83/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, según la redacción dada por el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, liga el concepto de medicamento para la ingeniería de tejidos con el no empleo de las células para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante, además del sometimiento de las células a manipulación sustancial. Las manipulaciones que se consideran no sustanciales han sido objeto de enumeración explícita en el anexo I del Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007. La Directiva 2009/120/CE antes mencionada amplía este concepto de regular como medicamento el empleo de células en función no similar a la terapia celular somática. Todo ello se ha incorporado al Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, a través de la modificación efectuada en su anexo I por la Orden SAS/1144/2010, de 3 de mayo<sup>(84)</sup>.

Hasta llegar a la actual normativa europea y española, la regulación de estos productos ha sido cambiante, la consideración de algunos de ellos como medicamentos se ha modificado a lo largo del tiempo y la cláusula de exclusión para medicamentos de fabricación no industrial se ha definido también de modo distinto. Con la actual normativa europea y española se ha producido, en este ámbito, la consolidación de las definiciones y procedimientos de las recientes regulaciones y esta situación de estabilidad actual permite una aproximación regulatoria que defina las normas para la autorización de estos productos.

Algunos de estos productos, que en su día no se consideraron medicamentos, se encuentran en situación de uso en la práctica en algunas instituciones hospitalarias y deberán, de acuerdo con las nuevas regulaciones antes mencionadas, obtener una autorización por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en consonancia con lo establecido en la disposición transitoria única de este Real Decreto. Entre ellos se encuentran el trasplante autólogo de condrocitos, el

---

implante de queratinocitos para tratamiento de quemados o el tratamiento de lesiones corneales con células troncales limbocorneales.

En virtud de todo lo anterior, este Real Decreto tiene como objeto regular los requisitos y garantías que deben cumplir los medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial para obtener la correspondiente autorización de uso por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, así como, establecer los requisitos de trazabilidad y de farmacovigilancia de estos medicamentos una vez autorizados.

En la actualidad no se han presentado problemas legales específicos sobre ello.

### 3.5.2. Consideraciones generales sobre la terapia génica germinal

En relación con la terapia génica en línea germinal parece haber bastante consenso internacional al considerarla una práctica como mínimo cuestionable y, en muchos casos, ilegal. En este momento no existe aún la terapia génica germinal como realidad científica, pero en previsión de futuros avances, la mayor parte de las legislaciones occidentales la prohíben. Esta prohibición en algunos casos es directa por ley y en otros casos adopta forma de normativa <sup>(85)</sup>.

### 3.5.3. Legislación general

La legislación internacional en relación con la genética ha recogido principios generales de actuación y únicamente de forma específica la prohibición de la práctica de la terapia germinal. La normativa internacional más directamente relacionada es la siguiente:

- a) Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos (UNESCO-1997, ONU-1998). Es una forma jurídica ágil en derecho internacional, tiene carácter universal, aprobada por 186 países y es específica sobre genoma<sup>(86)</sup>.
- b) Declaración Universal Derechos Humanos de Generaciones Futuras. 1994: Art. 3: *“las personas que pertenecen a las generaciones futuras*



*tienen derecho a la vida y preservación de la especie humana y se prohíbe causar daño a la vida en particular con actos que comprometan de forma irreversible la preservación de la especie humana, el genoma y herencia genética... y también se prohíbe intentar destruir en todo o en parte un grupo étnico... ”*<sup>(87)</sup>.

- c) Convenio 4/4/97 del Consejo de Europa sobre derechos humanos y biomedicina. Oviedo 1997. Capítulo IV Genoma Humano. Art 13: *“Intervenciones sobre el genoma humano. Únicamente podrá efectuarse una intervención que tenga por objeto modificar el genoma humano por razones preventivas, diagnósticas o terapéuticas y sólo cuando no tenga por finalidad la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia”*. La interpretación del convenio se somete al tribunal Europeo de Derechos Humanos y se encuentra en preparación un protocolo adicional sobre genética humana<sup>(88)</sup>.

La legislación interna europea es básicamente similar en todos los países, en algunos casos se basan en el *soft law*, que son resoluciones no obligatorias de los organismos internacionales y sólo constan de un enunciado ético, formulado por objetivos y no por reglas detalladas y precisas o principios éticos y recomendaciones<sup>(89)</sup>.

La legislación británica (en la línea intermedia entre la legislación de Estados Unidos y la de la Europa continental) es la más permisiva en investigación y aplicación de técnicas genéticas. A pesar de ello, muestran precaución en relación con la manipulación de la línea germinal<sup>(90)</sup>.

La legislación alemana es muy restrictiva y se mueve en un marco de prohibición absoluta de la terapia génica en la línea germinal y un control muy estricto tanto ético como legal de la manipulación exclusivamente terapéutica de las células somáticas<sup>(91)</sup>.

---

La legislación francesa hace un planteamiento claramente dirigido a la terapéutica y a su eficacia para la generación presente prohibiendo las manipulaciones que puedan afectar a generaciones futuras<sup>(92)</sup>.

La legislación de Estados Unidos es muy variable según el estado y resulta en general más permisiva que la europea. Se debate todavía la aceptabilidad de la terapia génica en línea germinal argumentando la posible eliminación de enfermedades en generaciones futuras<sup>(93)</sup>.

#### 3.5.4. Regulación de los proyectos de terapia génica en España

La regulación de los proyectos en terapia génica en España, se rige por la Agencia Europea del Medicamento (EMA en sus siglas en inglés)<sup>(94)</sup>.

Según la página web de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular: “La EMA fue creada por el Reglamento (CEE) nº 2309/93, de 22 de julio de 1993. La EMA, con sede en Londres, es la encargada de coordinar los recursos científicos existentes en los estados miembros con el fin de evaluar y supervisar los medicamentos de uso humano y veterinario. Sobre la base del dictamen de la Agencia, la Comisión Europea autoriza la comercialización de nuevos medicamentos y arbitra entre los estados miembros de que otros medicamentos en caso de desacuerdo”<sup>(95)</sup>. Esta sociedad regula la terapia génica incluida dentro del grupo denominado medicamentos de terapia avanzada: “Son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces”.

Para poder realizar un ensayo clínico sobre terapia génica, éste debe ajustarse a las regulaciones de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de medicamentos y productos sanitarios, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y su versión actualizada el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se

regulan los ensayos clínicos con medicamentos y el Real Decreto 1564/1992, de 18 de diciembre, por el que se desarrolla y regula el régimen de autorización de los laboratorios farmacéuticos e importadores de medicamentos y la garantía de calidad en su fabricación industrial. Además, requiere de un Comité Ético de Investigación Clínica, formado por personal de los centros participantes, el acuerdo de la Dirección de los centros que participan en el estudio y la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Una vez que los ensayos clínicos han sido satisfactorios, para poder comercializar el producto de terapia génica, debe solicitarse a la Agencia Española del Medicamento (AEM), al servicio de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), su autorización. Existen excepciones en los que este procedimiento no está centralizado en Europa. Estas excepciones están recogidas en el Reglamento (CE) n° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada, y cuya autorización corresponde a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Existen ciertos medicamentos que reciben una autorización de uso (no de comercialización) en el marco de una institución hospitalaria, que será la responsable del medicamento y que estará regulado por el Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial.

Finalmente, el Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios es la última actualización sobre los medicamentos de terapia avanzada<sup>(84)</sup>.

---

### 3.6. LIMITACIONES TÉCNICAS DE LA TERAPIA GÉNICA

Aún tenemos algunas limitaciones y detalles técnicos que perfeccionar en la terapia génica. Si bien es cierto que ya conocemos el genoma humano, todavía falta por determinar cómo estos genes interactúan entre sí. Este conocimiento es fundamental si se desea intervenir apropiadamente en este microambiente.

El principal problema técnico que aún está en estudio, es el de perfeccionar el método de distribución de los genes terapéuticos al interior de la célula. Con frecuencia en la mayoría de los estudios los genes introducidos no alcanzan las células apropiadas, y, si las alcanzan, la expresión de los mismos es pobre. En muchos casos la transferencia tiene una eficiencia muy baja, que no resulta suficiente para obtener/detectar una determinada cantidad del producto génico deseado.

El vector utilizado supone también una limitación, ya que muchos vectores virales presentan la dificultad de que son inespecíficos, es decir que depositan su carga de ADN al azar, lo cual puede ser nocivo si interfiere con un gen que está funcionando normalmente, pues podría interaccionar con oncogenes o con genes supresores y provocar cáncer.

Otro problema que se ha detectado es que muchas veces los genes introducidos funcionan pobremente o se desactivan después de un tiempo. Esto se ha relacionado con la respuesta inmunológica que desencadenan los vectores virales, que haría que el sistema inmune eliminara las células que éstos han “infectado” con el gen normal.

Varias de las dificultades que hemos mencionado conllevan la necesidad de perfeccionar el conocimiento sobre la regulación de la expresión genética y sobre cómo garantizar la estabilidad de los genes introducidos. En resumen, existen tres problemas principales o limitaciones aún no resueltas en el desarrollo de la terapia génicas:

- a) Encontrar el órgano diana.
- b) El método de transferencia génica.
- c) La cantidad de gen efectivo que ingresa a la célula.

---

### 3.7. ANATOMÍA HEPÁTICA DEL CERDO

El hígado del cerdo es relativamente grande, con un peso aproximado que varía entre 500 y 1000g, dependiendo del tamaño del animal.

Está dividido en 4 lóbulos principales (lateral derecho, medial derecho, lateral izquierdo y medial izquierdo) por tres profundas cisuras interlobares. Además, presenta un lóbulo cuadrado (rudimentario) y un lóbulo caudado que proyecta hacia la derecha y dorsalmente, una apófisis caudada (la apófisis papilar no llega a desarrollarse o es muy rudimentaria). La vesícula biliar se sitúa entre el lóbulo medial derecho y el cuadrado, y también en parte de la superficie del lóbulo medial izquierdo (figura 9).

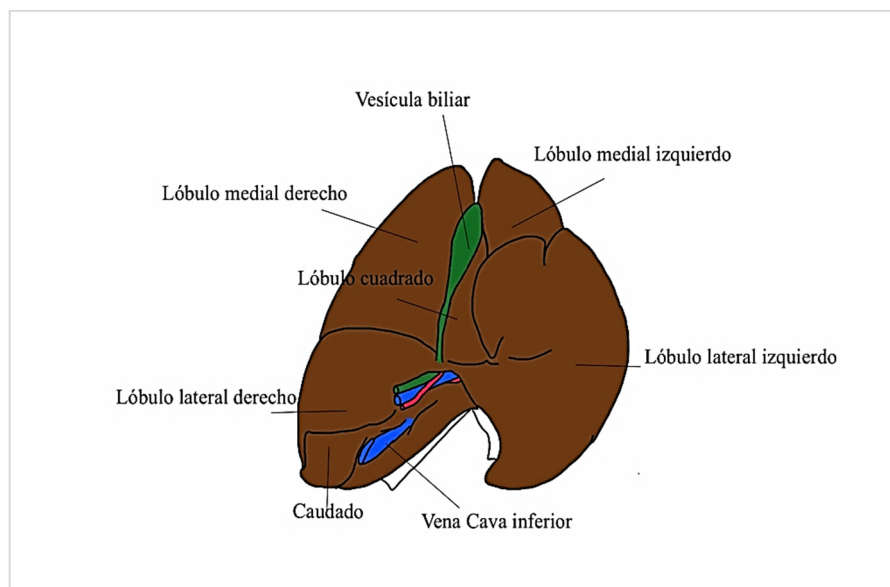


Figura 9.- Anatomía hepática del cerdo y vesícula biliar

Macroscópicamente, a diferencia del hígado humano, el hígado del cerdo es multilobulado y multisegmentado, con vascularización a través de las arterias hepáticas y del sistema venoso portal. Tiene escasa fijación al espacio retroperitoneal, de modo que es muy fácil movilizarlo en su totalidad. Suele presentar un ligamento triangular izquierdo de pequeño tamaño, con una sujeción muy laxa a los pilares del diafragma y que sigue el trayecto de la vena cava intrahepática. Por otra parte, la

multilobularidad y escasa adhesión retroperitoneal de este órgano hace que los diferentes segmentos cuelguen y dificulten la localización de la vesícula biliar.

Al igual que en el hombre, lo que distingue verdaderamente la segmentación del hígado no es la apariencia anatómica externa, sino la vascularización por las ramas portales, tal como se muestra en la figura 10.

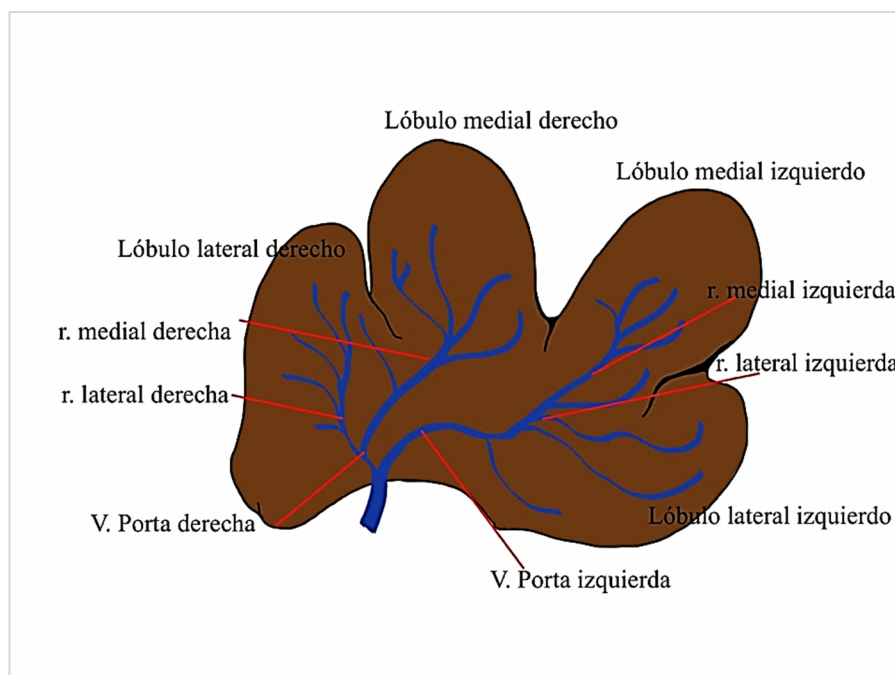


Figura 10.- Segmentos hepáticos y vascularización portal. Modificado: Zanchet DJ, Montero EFS. Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality depiction. Acta Cir Bras 2002. Nov-Dec;17(6)

La vena porta se bifurca en su recorrido intrahepático:

- a) La vena porta izquierda discurre varios centímetros sin ramificarse en sentido horizontal, hasta bifurcarse en una rama terminal para los segmentos laterales izquierdos y otra para el segmento medial del lóbulo izquierdo en dirección ascendente.
- b) La vena porta derecha intrahepática es mucho más corta, se divide en una rama ascendente para los segmentos mediales del lóbulo derecho, relativamente próxima a la vesícula, y otra rama de recorrido horizontal para los segmentos más laterales y posteriores del hígado derecho.

Las venas suprahepáticas drenan a la vena cava prácticamente a nivel intrahepático, de modo que resulta muy difícil disecarlas del parénquima hepático. La vena suprahepática izquierda tiene un gran calibre y resulta del drenaje de tres venas: una descendente del lóbulo medial izquierdo y dos ramas oblicuas del lóbulo lateral izquierdo. La vena suprahepática media es de menor calibre y es el confluente de una rama del lóbulo medial izquierdo y otra del lóbulo medial derecho. Finalmente, la vena suprahepática derecha es casi del mismo tamaño que la izquierda y proviene de dos venas, una del lóbulo medial derecho y otra más horizontal proveniente de los segmentos laterales y posteriores (figura 11). Los segmentos laterales y posteriores, que rodean la vena cava retrohepática, drenan mediante múltiples ramas de pequeño calibre directamente a la vena cava <sup>(96)</sup>.

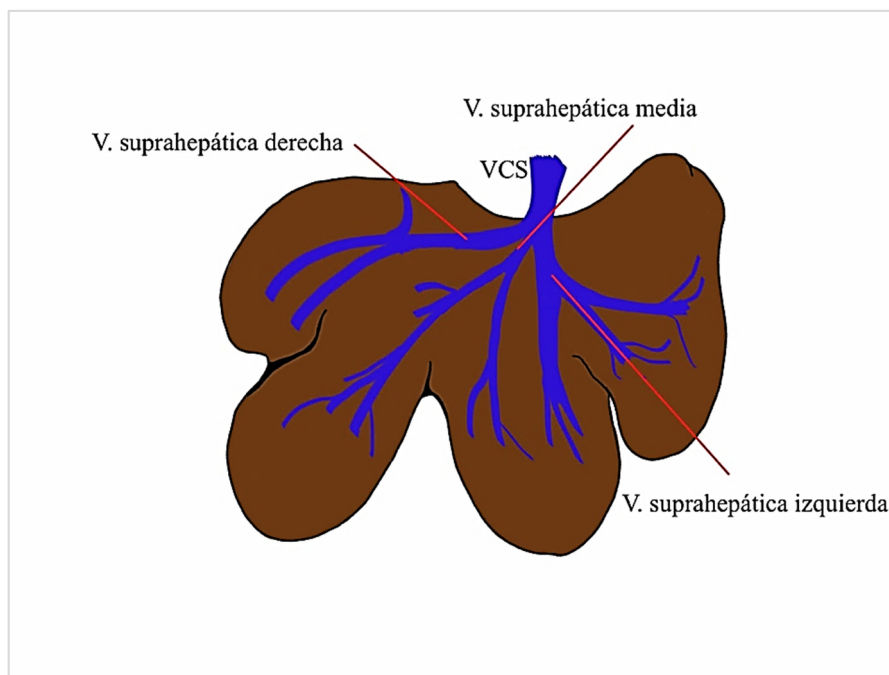


Figura 11.- Anatomía venas suprahepáticas. Modificado: Zanchet DJ, Montero EFS. Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality depiction. Acta Cir Bras 2002. Nov-Dec;17(6)

La vena cava inferior retrohepática, a diferencia de la anatomía humana, es completamente intrahepática. El parénquima hepático acompaña en forma de embudo la cava infrahepática, casi hasta la altura de las venas renales. Esta zona del parénquima hepático es el proceso caudado.



La vascularización del hígado es doble, a través de la vena porta y de la arteria hepática [102]. Debido a la falta de grasa en estos animales, las principales estructuras se transparentan por debajo del ligamento gastrohepático. En la parte derecha de esta área se identifica fácilmente el colédoco y su recorrido por delante de la vena porta dirigiéndose desde la placa hiliar hacia el píloro. Inmediatamente por detrás se encuentra la vena porta, acompañada a su derecha de un ganglio periportal de gran tamaño, semejante a la anatomía humana. Aproximadamente a un centímetro a la izquierda del colédoco y a un centímetro por encima del estómago se encuentra la bifurcación de la arteria hepática común, que en esta localización se bifurca en 3 ramas: una rama muy fina que se dirige hacia el lóbulo derecho del hígado a la izquierda del colédoco, la arteria gastroduodenal y la arteria hepática propia. Ésta última discurre a la izquierda y más o menos paralela a la curvatura menor gástrica. La arteria hepática propia, a la altura de la incisura angularis del estómago da una rama para el estómago, equivalente a la arteria gástrica.

### 3.7.1. Sistema venoso portal extrahepático

Está formado por la vena mesentérica superior (VMS) y la vena esplénica, que confluyen por detrás del cuerpo pancreático en la vena porta. La vena porta se divide en sus dos ramas principales en el hígado, en el interior del parénquima hepático. La vena esplénica posee un calibre más pequeño y es retropancreática a nivel del cuerpo del páncreas, pero discurre paralela a la arteria esplénica a la altura de la cola del páncreas. La VMS tiene un grueso calibre ya que drena toda la sangre del paquete intestinal. Al no existir transcavidad de los epiplones, basta con disecar el borde inferior del cuerpo y del proceso uncinado del páncreas, de las adherencias laxas al colon y yeyuno para acceder directamente a la VMS.

### 3.7.2. Sistema venoso cava inferior

La vena cava inferior se origina en la entrada de la pelvis, con la confluencia de las venas ilíacas comunes y discurre por el retroperitoneo a la derecha de la arteria aorta abdominal. A ella confluyen algunas ramas lumbares de grueso calibre. En la

---

cara anterior de la vena cava inferior sólo drenan las dos venas gonadales, a la misma altura que la bifurcación aórtica.

En su trayecto ascendente, la vena cava inferior recibe la vena renal derecha justo a la altura de la rodilla duodenal. La vena renal izquierda, es más larga y cruza por delante de la aorta, y a su vez recibe drenaje de la glándula suprarrenal izquierda. Ascendiendo, la vena cava inferior se hace totalmente intrahepática y recibe las venas suprahepáticas en el espesor del parénquima hepático. Justo antes de su entrada en el parénquima hepático se le incorpora la vena suprarrenal derecha.

### 3.7.3. Vesícula biliar

La vesícula biliar se sitúa entre el lóbulo medial derecho y el lóbulo cuadrado, aunque también se ubica en parte de la superficie del medial izquierdo. La vesícula biliar queda dispuesta en profundidad, y no llega a rebasar el borde ventral del hígado. El conducto cístico se une al conducto hepático común para formar el conducto colédoco, cuya desembocadura tiene lugar en una papila duodenal, situada a unos 2,5 cm del píloro.

## 3.8. ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL HÍGADO DEL CERDO

### 3.8.1. Origen embrionario del hígado

El parénquima hepático surge por un brote epitelial de origen endodérmico a nivel del duodeno, que forma la yema hepática en forma de Y invertida. La rama más craneal origina el hígado y el conducto hepático, mientras la rama posterior origina la vesícula biliar y el conducto cístico. La porción que se mantiene unida al duodeno da lugar al conducto colédoco.

### 3.8.2. Estroma hepático

Está representado por una cápsula fibroconjuntiva revestida por una serosa derivada del peritoneo visceral denominada cápsula de Glisson. El grosor y las características de esta estructura dependen de la especie animal. Esta cápsula se hace más gruesa a nivel del hilio por donde penetra para emitir tabiques o septos que dividen el órgano en lóbulos y lobulillos. Además, irradian de ella una trama tridimensional de fibras colágenas y reticulares que sirven de sostén a los elementos parenquimatosos. También pueden encontrarse a nivel de la cápsula de algunas fibras musculares lisas, troncos nerviosos, así como fibras sensitivas.

### 3.8.3. Parénquima hepático

El hígado es la víscera de mayor tamaño del cerdo. Se considera un órgano central vital. En el hígado se distinguen diferentes tipos celulares (figura 12):

- Las células parenquimales o hepatocitos (70% del total), que confieren al hígado sus características bioquímicas y funcionales.
- Células endoteliales, que se encuentran tapizando la luz del sinusoides. El espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos se denomina espacio de Disse.

- Células de Kupffer, que son los macrófagos que colonizan el sinusoides. Forman parte del sistema reticuloendotelial y contribuyen a la eliminación del material que pudiera circular por sangre evitando que entre en contacto directo con el hepatocito. Tienen un papel muy importante en los procesos inflamatorios del hígado.
- Células de Ito. Se trata de lipocitos con capacidad de almacenar lípidos y de la producción de la matriz celular.
- Células de Pit, que son los linfocitos del hígado (*natural killer*) y poseen una actividad citotóxica más intensa que las células en la sangre periférica.
- Células epiteliales. Son las células que forman los conductos biliares.

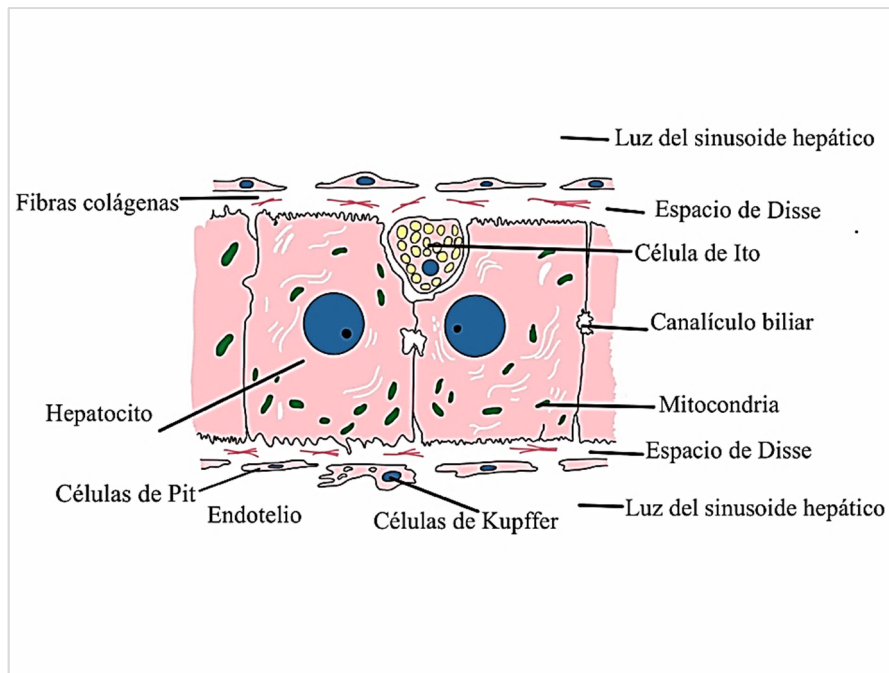


Figura 12.- Parénquima hepático y sus distintos tipos celulares. Fuente: Ross M., (2013) Histología: Texto y Atlas en color con biología celular y molecular. 4ª edición. Editorial Panamericana

Según su función en el parénquima hepático se describen tres tipos de unidades:

a) **Lobulillo hepático**

Es una unidad estructural organizada alrededor de una vena central que se configura por la confluencia de los sinusoides hepáticos. Entre los sinusoides hepáticos se localiza una doble cadena de hepatocitos (cordones de Remark) separados por un espacio denominado espacio de Disse. El otro elemento estructural del lobulillo lo constituyen los canalículos biliares formados a nivel del borde interno de ambas filas de hepatocitos por la invaginación de su membrana, y que funcionan como un canal para vehiculizar la bilis excretada por el hepatocito. Estos lobulillos tienen forma hexagonal y están bien delimitados por gruesas trabéculas interlobulillares. Los espacios portales están situados por fuera de los lobulillos, alrededor de tres de los seis ángulos del lobulillo (figura 13).

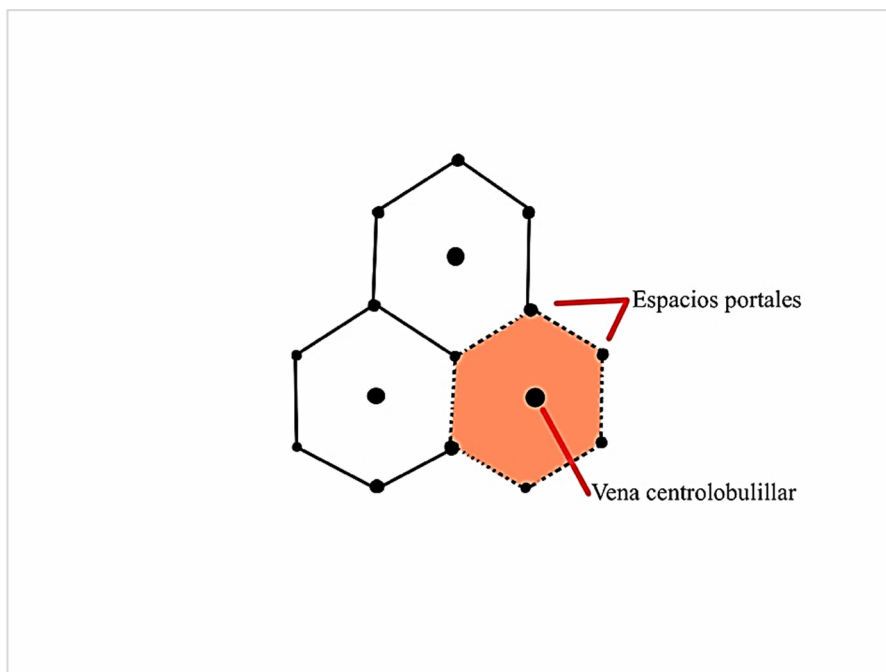


Figura 13.- Lobulillo hepático o clásico. Fuente: Ross M., (2013) Histología: Texto y Atlas en color con biología celular y molecular. 4ª edición. Editorial Panamericana

---

Estos elementos, que conforman el lobulillo clásico, tienen las siguientes características:

- *Cordones de Remark*: elemento estructurado por una doble fila de hepatocitos. Los hepatocitos son células poliédricas con núcleo esférico situado centralmente con uno o más nucléolos y grumos de cromatina. El citoplasma contiene mitocondrias, complejo de Golgi, lisosomas, peroxisomas, enzimas, glucógeno, gránulo de pigmento y retículo endoplásmico liso y rugoso. Esta célula presenta tres áreas funcionales: la superficie externa, adyacente a los sinusoides, la cual presenta microvellosidades separada únicamente por el espacio de Disse, la superficie interna de contacto entre las dos filas de células y la superficie que forma el canalículo biliar.
- *Sinusoide hepático*: tiene la estructura típica de los capilares. Presenta células endoteliales discontinuas, algunas de las cuales son fagocitarias y forman parte del sistema de macrófagos del organismo. Éstas células pueden presentarse con morfología aplanada inactiva o como células de aspecto triangular activas, denominadas células de Kupffer.
- *Vena central*: se forma por la convergencia de los sinusoides hepáticos, presenta un endotelio y un subendotelio. Este vaso venoso vierte la sangre directamente a la vena sublobulillar o vena intercalar que se encuentra en la periferia del lóbulo. Las venas sublobulillares cursan a lo largo de la base de los lobulillos y finalmente forman las venas hepáticas, que se unen a la vena caudal.
- *Canalículo biliar*: esta estructura se forma por el espacio comprendido entre la unión de dos células hepáticas yuxtapuestas. Las membranas celulares que bordean y forman este espacio presentan microvellosidades y complejos de unión que impiden que la bilis se

derrame hacia otros espacios intercelulares. La bilis cursa en sentido opuesto al sentido de la sangre, es decir, hacia fuera del lobulillo por tanto nunca se une la sangre con la bilis dentro del lobulillo. Los hepatocitos absorben bilirrubina, la conjugan y segregan sales biliares, proteínas y colesterol. La bilis después de ser sintetizada por los hepatocitos, sale por el sistema de canalículos hasta llegar a los conductos biliares, que se localizan a nivel del espacio porta o de Kiernan.

### b) Lobulillo portal

Es una unidad funcional centrada alrededor del conducto biliar del espacio porta. Se define como un área triangular compuesta por el parénquima de tres lobulillos hepáticos adyacentes, cuyos vértices son las venas centrales, tal y como se muestra en la figura 14.

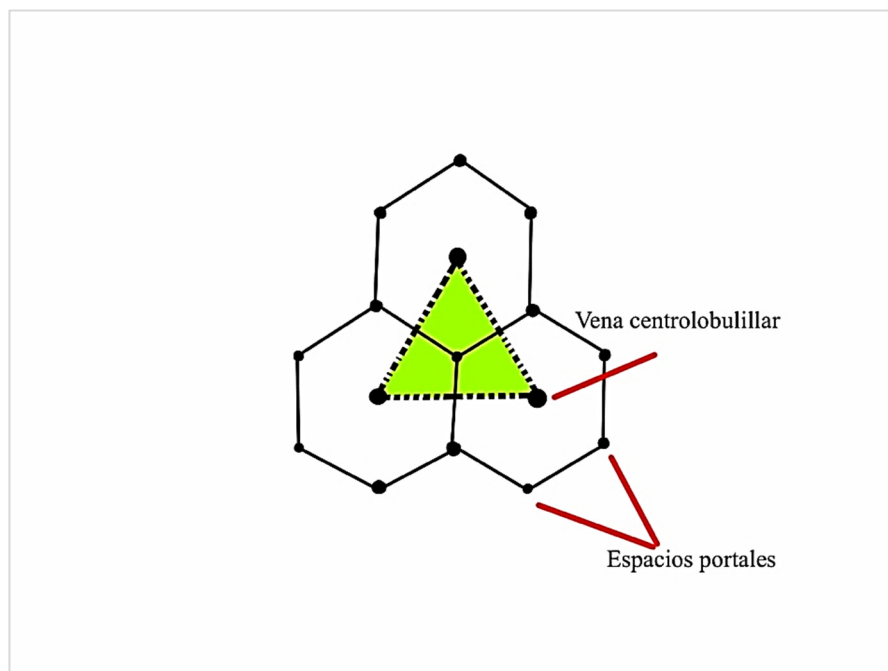


Figura 14.- Lobulillo portal. Fuente: Ross M., (2013) Histología: Texto y Atlas en color con biología celular y molecular. 4ª edición. Editorial Panamericana

---

c) **Acino hepático**

Se define como una zona oval, cuyo eje gira alrededor de la vena porta del espacio del mismo nombre y los polos son las venas centrales de dos lobulillos, destacándose tres zonas de diversa actividad metabólica entre el eje y la vena central del lobulillo. Las células próximas a la vena central reciben menos oxígeno y nutrientes que las que están periféricamente, donde vierte la sangre de la rama de la arteria hepática y de la vena porta para formar los sinusoides (figura 15).

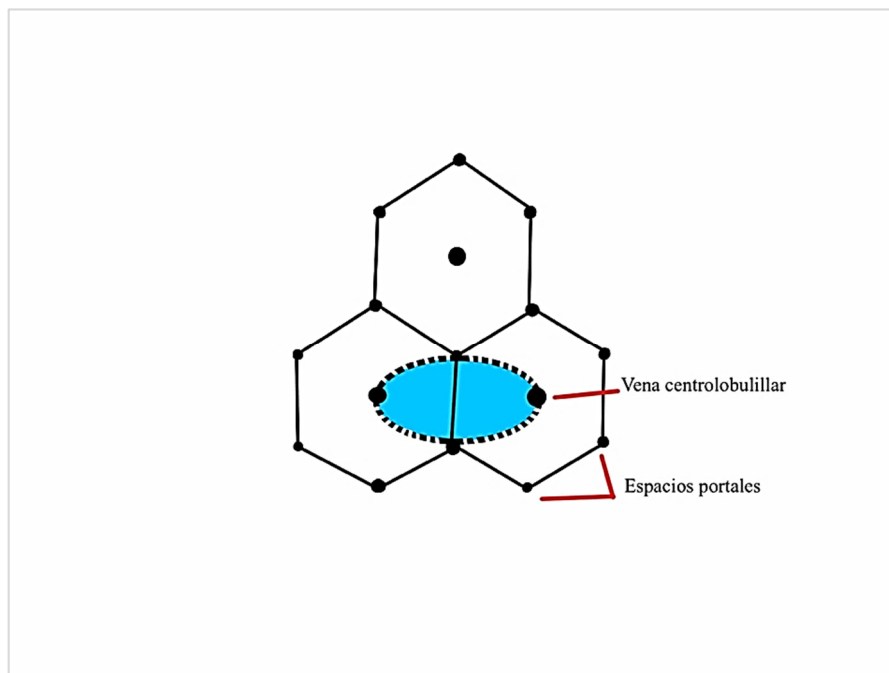


Figura 15.- Acino hepático. Fuente: Ross M., (2013) Histología: Texto y Atlas en color con biología celular y molecular. 4ª edición. Editorial Panamericana

#### 3.8.4. Espacio porta o de Kiernan

Está conformado por el espacio a nivel de la confluencia de los extremos de los lóbulos y que están delimitados por tejido conjuntivo procedente de la cápsula. Aquí pueden observarse las siguientes estructuras.



- Rama de la vena porta
- Rama de la arteria hepática
- Conducto biliar
- Vaso linfático

Los conductos biliares presentan epitelio simple cúbico y una lámina propia de tejido conjuntivo. La vena presenta endotelio, luz amplia y paredes muy finas, mientras que la arteria presenta la pared mucho más gruesa (figura 16)

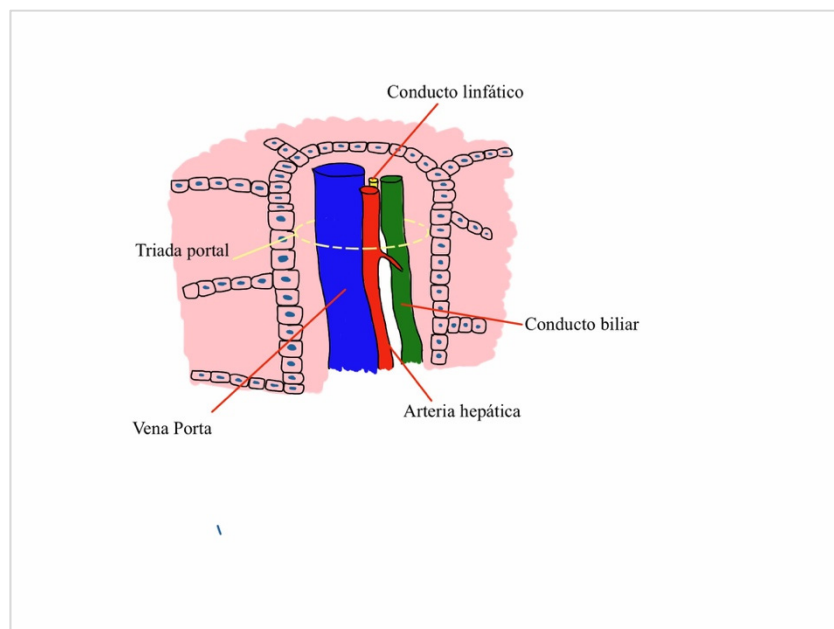


Figura 16.- Espacio porta. Fuente: Ross M., (2013) Histología: Texto y Atlas en color con biología celular y molecular.4ª edición. Editorial Panamericana

---

### 3.9. FISIOLÓGÍA HEPÁTICA

El hígado es una glándula que está estructurada para cumplir numerosas funciones tanto metabólicas como endocrinas y exocrinas. Ocupa un lugar de primordial importancia en la regulación del mecanismo energético del organismo. Recibe a través del sistema porta la mayor parte de los productos de absorción intestinal (carbohidratos, aminoácidos y ciertos ácidos grasos de cadena corta) y productos resultantes del catabolismo bacteriano de los nutrientes. Estos compuestos sufren diversos procesos metabólicos, captación, almacenamiento y procesos de biotransformación que facilitan su eliminación. De este modo la sangre que drena del hígado a la vena cava está desprovista de los productos tóxicos provenientes de la sangre portal. A grandes rasgos se encarga del metabolismo de los hidratos de carbono, metabolismo de lípidos y de los aminoácidos y proteínas.

#### 3.9.1. Metabolismo de los carbohidratos

Es el principal responsable de la homeostasia de los carbohidratos, consumiendo, almacenando y produciendo glucosa. Absorbe glucosa y hormonas intestinales y pancreáticas. Los carbohidratos ingeridos en la dieta en forma de polisacáridos o como disacáridos, se transforman bajo la acción de enzimas en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, ribosa), llegan al hígado por la vena porta, siendo absorbidos, en aproximadamente un 50%, por los hepatocitos para ser metabolizados. Según la situación de los hepatocitos, éstos cumplen distintas funciones. Los hepatocitos situados periportales se encargan de la glucogénesis (transformación de carbohidratos a glucógeno), que es la principal forma de almacenamiento de carbohidratos del organismo y los hepatocitos situados perivenosos se encargan de la glucólisis (oxidar la glucosa para obtener energía).

La glucemia se controla indirectamente por medio de la glucorregulación hecha por la insulina y el glucagón. La hiperglucemia estimula la secreción de insulina favoreciendo la formación de glucógeno que a su vez bloquea la producción de glucosa<sup>(97)</sup>.

### 3.9.2. Metabolismo de las proteínas

El hígado capta aminoácidos de la circulación portal y a través de la transaminación los transforma en proteínas estructurales y plasmáticas (albúmina, transferrina, ceruloplasminas, globulinas y lipoproteínas), enzimas, nucleótidos y el radical heme. En la desaminación (degradación de los aminoácidos) hay producción energética a través del ciclo de Krebs o por neoglucogénesis.

La actividad de síntesis es intensa y representa cerca del 25% del consumo energético, es continua y no presenta posibilidad de almacenamiento local, produce enzimas implicadas en la depuración de toxinas. Las células extra- parenquimatosas participan de la síntesis del factor VIII y las células de Ito de la proteína “retino-band” y de alfa-1-antitripsina. También se sintetizan el factor I de crecimiento, la insulina-like (IgF1) y proteínas de ligación.

La ureogénesis ocurre estrictamente en el hígado, transforma casi la totalidad del amonio producido en los riñones y por las bacterias intestinales en urea.

### 3.9.3. Metabolismo de los lípidos

Encargado también de la degradación de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. El hígado participa del metabolismo de la mayoría de los ácidos grasos, excepto de los ácidos linoleico y linoleico, que deben ser suministrados por la alimentación. Los ácidos grasos originados en la lipólisis contribuyen a la síntesis de triglicéridos en el hígado, excretados en forma de lipoproteínas de bajo peso molecular.

La síntesis de triglicéridos se hace por esterificación de ácidos grasos libres en el hígado. Hay, además, producción de fosfolípidos y lipoproteínas, como la apoproteína B, que se ligan a los triglicéridos y pasan a la circulación. En la luz intestinal, los triglicéridos sufren hidrólisis parcial por la acción de la lipasa, produciendo glicerol que es hidrosoluble y es transportado hacia el hígado, donde formará complejos con las sales biliares.

---

La síntesis hepática de colesterol depende de la cantidad absorbida por el intestino de este esteroide, además de otros factores como catecolaminas y estrógenos. El colesterol se excreta en la bilis, siendo convertido en ácidos biliares.

#### 3.9.4. Hemostasia

Es el responsable de la síntesis, activación y aclaramiento de los diversos factores de coagulación, de sus inhibidores y de la fibrinólisis. La hemostasia primaria depende del número y de la función plaquetaria, en cuanto que la coagulación depende de la activación de factores.

El hígado sintetiza la mayoría de los factores de coagulación, con producción exclusiva del fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II) y factores V, VII, IX y X. Los factores II, VII, IX y X son glicoproteínas cuya síntesis es dependiente de la absorción de vitamina K, encontrándose disminuidos en presencia de colestasis<sup>(98)</sup>.

#### 3.9.5. Secreción de bilis

La bilirrubina es un producto liposoluble y tóxico para el organismo, que procede del metabolismo del grupo *hem* de varias proteínas. Es transformada en el interior del hepatocito mediante reacciones de conjugación en un producto no tóxico e hidrosoluble, capaz de ser eliminado formando parte de la bilis; llega al intestino y se transforma de nuevo en bilirrubina libre, la cual es absorbida nuevamente por la mucosa intestinal, estableciéndose así la circulación enterohepática de la bilirrubina<sup>(99,100)</sup>.

### 3.10. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Existen diferentes enfermedades genéticas que, a día de hoy no tienen cura y para las que se están desarrollando distintos tipos de terapia génica con el fin de combatirlas.

Uno de los principales problemas de esta terapia es conseguir el ambiente adecuado en un órgano, para que el gen entre en el interior de la célula deficitaria donde pueda llevar a cabo su actividad.

Existen numerosos estudios en los cuales se han llevado a cabo estos procedimientos, tomando como órgano diana el pulmón, el corazón, el hígado, etc. Se han utilizado distintos tipos de transferencia génica con vectores fisicoquímicos o no virales y virales, tanto *in vivo* como *ex vivo*, obteniendo resultados prometedores. Se han identificado deficiencias en estos estudios en el momento de la entrega del gen y en la permanencia de éste en el tejido diana, principalmente debido a diferentes motivos como la eliminación del gen por células del organismo, la imposibilidad de atravesar la membrana celular o la incapacidad de integrarse y penetrar en el núcleo de la célula.

En el presente estudio realizamos un procedimiento quirúrgico para aislar vascularmente el hígado de un animal vivo para intentar crear un ambiente adecuado, disminuyendo los factores que podrían interferir con la permanencia del gen en el órgano, para la transferencia génica eficaz.

Hemos decidido realizar el procedimiento en el hígado porque es el principal órgano encargado de la producción de proteínas y cuenta con la ventaja de ser accesible quirúrgicamente, pudiendo ser aislado vascularmente y con ello mediante la inyección hidrodinámica del gen intentar que éste sea más eficiente a la hora de penetrar la membrana celular.



# Hipótesis y Objetivos





## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO**

Es posible diseñar y reproducir la técnica quirúrgica de exclusión vascular hepática para la transferencia génica de forma eficaz *in vivo* en un modelo animal porcino.

---

## 4.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### 4.2.1 Objetivo principal

Desarrollar un modelo quirúrgico *in vivo* de transferencia génica eficaz mediante la exclusión vascular hepática total en un modelo porcino.

### 4.2.2. Objetivos secundarios

- Evaluar la reproducibilidad de la técnica quirúrgica manteniendo la viabilidad de los animales.
- Definir las condiciones adecuadas mediante las cuales obtenemos una transferencia génica eficaz.
- Evaluar la entrega, transcripción y traducción en el modelo quirúrgico óptimo.
- Realizar la transferencia génica utilizando un gen humano (interleuquina-10) con interés terapéutico para el trasplante de órganos.

# Material y Métodos

---



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio experimental y analítico, realizado sobre cerdos adultos sanos.

Los experimentos fueron llevados a cabo en el animalario del Centro de Investigación del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia en el periodo comprendido entre septiembre de 2011 y octubre de 2012. Estos experimentos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Bienestar animal del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (nº de expediente AP-151/11).

---

## 5.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio experimental se realizó sobre 26 cerdos hembras de la raza White large. De los cuales 2 fueron destinados a crear el modelo quirúrgico, y 14 cerdos se destinaron a valorar el modelo quirúrgico óptimo para realizar la transferencia génica.

Una vez establecida la técnica óptima se utilizaron 10 cerdos más, a 4 de ellos se les administró el gen terapéutico midiendo el ADN, ARN, proteína en tejido y proteína en sangre y los otros 6 cerdos fueron estudiados como control. Dos cerdos fallecieron en el estudio y no fueron incluidos en los resultados.

El cuidado de los animales corrió a cargo de veterinarios y personal auxiliar con experiencia, siguiendo las directrices del Real decreto 223/1988, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Durante todo el proceso, los animales fueron cuidados, mantenidos y posteriormente sacrificados y destruidos conforme a las normas sanitarias vigentes.

### 5.3. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico. El tamaño de los plásmidos varía desde 1 a 250 kb. Están presentes de manera natural en bacterias y, en ocasiones, en organismos eucariotas, como las levaduras. Los plásmidos se pueden utilizar para transferir genes en células humanas como potencial tratamiento por terapia génica.

#### 5.3.1. Plásmido con la proteína verde fluorescente (eGFP).

La proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína monomérica de unos 230 aminoácidos con una estructura especial de forma que cuando es iluminada con luz ultravioleta, produce una brillante fluorescencia verde. Por esta característica esta proteína se comporta como una señal luminosa capaz de expresarse en células mediante las técnicas rutinarias de transgénesis. Su código genético puede fusionarse a otras proteínas, proporcionando a éstas un dominio fluorescente extra a modo de marca o etiqueta luminosa<sup>(101)</sup>.

Utilizamos el plásmido p3C-eGFP de 6,45 kb, en una concentración de 20 µg/ml, conteniendo el ADN complementario de la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) y controlado por el promotor del citomegalovirus (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 de 4,7kb (Clontech Laboratories®, Saint-Germain-en-Laye, Francia).

#### 5.3.2. Interleuquina 10 (IL-10).

La interleuquina 10 es una citoquina antiinflamatoria de clase 2 codificada por el gen IL-10 con efectos inmunomoduladores pleiotrópicos<sup>(102)</sup>. Entre las funciones de la interleuquina 10 se encuentra la de disminuir las citoquinas y las moléculas coestimuladoras de los macrófagos, suprimir la presentación de antígenos por células

---

especializadas e inhibir la expresión de las citoquinas proinflamatorias<sup>(103)</sup>, que son las responsables de la respuesta inmunosupresora.

Utilizamos el plásmido p2F-hIL 10, el cual se obtiene a partir del plásmido base pVITRO2 (Invivogen, Francia), conteniendo el gen humano de la IL10. Los plásmidos basados en pVITRO2 permiten la cotransfección de dos genes simultáneamente.

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



#### 5.4. PROTOCOLO ANESTÉSICO Y PREPARACIÓN PRE-QUIRÚRGICA

A todos los animales se les aplicó el siguiente protocolo anestésico: ketamina 5-10 mg/kg por vía intramuscular (Imalgene® 100, Merial - Francia), midazolam 0,3 mg/kg por vía intramuscular (Hospira® 1 mg/ml, Madrid-España) y propofol 4-6 mg/kg por vía intravenosa (Lipuro® 2%, Braun, Melsungen-Alemania) y se mantuvieron con sevoflurano 2,5% por vía inhalatoria (Sevorane®, Laboratorios Abbott, Madrid-España).

Para la relajación muscular, los animales fueron tratados con bromuro de vecuronio 0,08 mg/kg por vía intravenosa (Norcuron®, Laboratorios Merck Sharp & Dohme, Madrid-España).

Una vez administrada la medicación anestésica, los animales fueron intubados y ventilados con una mezcla de óxido nitroso, oxígeno y sevoflurano. La analgesia intraoperatoria se realizó con cloruro mórfico a 0,4 mg/kg por vía intravenosa (Morfina B®, Braun, Barcelona-España) y la analgesia postoperatoria con buprenorfina a 0,02 mg/kg por vía intravenosa (Buprex®, Schering-Plough, Madrid-España).

Se les introdujo un catéter de vía central Arrow™ de 7F de tres luces en la vena yugular externa para la infusión de líquidos y otro catéter en la arteria femoral (Figura 17), tanto para la monitorización de la presión arterial como para la extracción de muestras de sangre, las cuales fueron utilizadas para la determinación de enzimas hepáticas, la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT).

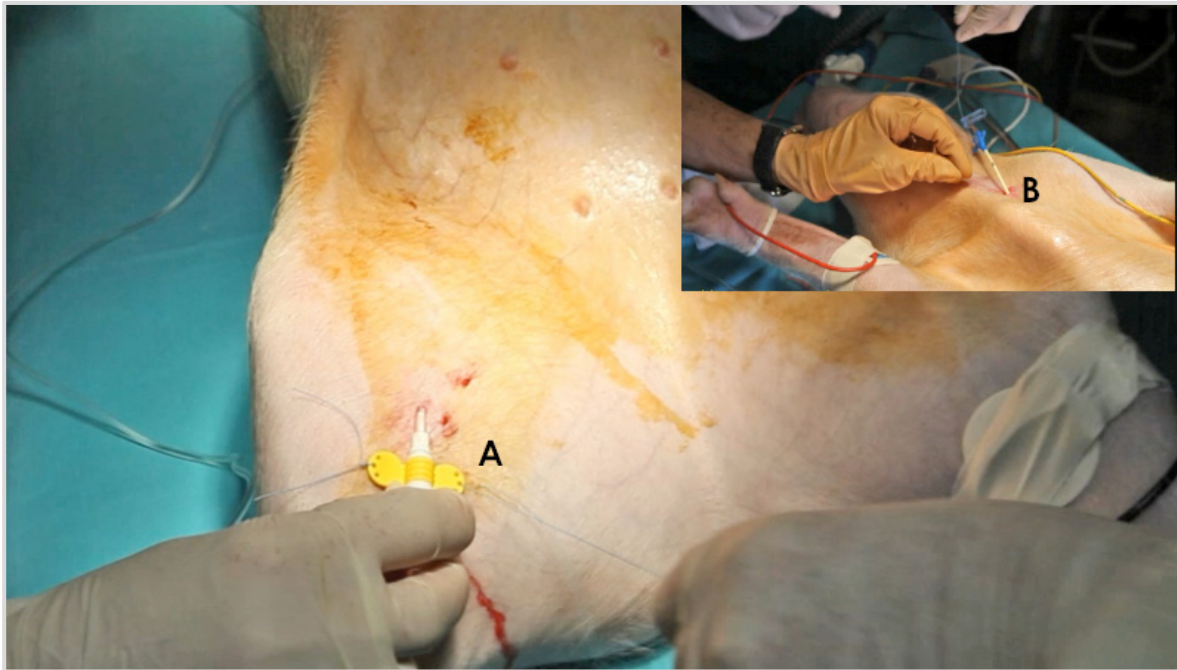


Figura 17.- A) Colocación del catéter en la arteria femoral. B) Colocación del catéter venoso central

## 5.5. EQUIPO Y MATERIAL QUIRÚRGICO

El equipo quirúrgico estuvo formado por dos cirujanos, un anestésista y un instrumentista. Se utilizó un monitor cardiaco (DASH 2500) para controlar las funciones vitales durante todo el procedimiento.

Durante la inducción anestésica, el procedimiento quirúrgico y el despertar se midieron los siguientes parámetros hemodinámicos:

- Presión arterial sistólica (mmHg)
- Presión arterial diastólica (mmHg)
- Frecuencia cardíaca (latidos / min)
- Saturación de oxígeno (%)
- Lectura del electrocardiograma

Se utilizó el siguiente instrumental quirúrgico para la realización del procedimiento (Figura 18):

- a) Equipo de laparotomía de cirugía mayor.
- b) Paños de tela estériles para aislar el campo quirúrgico.
- c) Compresas y gasas quirúrgicas.
- d) Hoja de bisturí nº 11 (Aesculap Braun™, Germany).
- e) Bisturí eléctrico.
- f) Cintas de goma vasculares (Devontm Covidien™).
- g) Clamps vasculares.
- h) Dispositivos de torniquete para realizar el clampaje.
- i) Cánula de aspiración quirúrgica (Bicakcilar™, Turkey).
- j) Tres tipos de suturas: Biosyn 5/0 (Covidien™), Prolene 6/0 (Ethicon™) y Dexon 2/0 (Covidien™).
- k) Grapadora de piel (Covidien™ Appose ULC 35W).

Además, se utilizó una bomba de perfusión hidráulica para la administración del plásmido a diferentes velocidades (10, 20, 40 y 60 ml/s) y volúmenes (200 ml,

---

400 ml y 600 ml). Durante todo el procedimiento se siguieron las normas de asepsia y antisepsia.



Figura 18.- Material para la realización del procedimiento

## 5.6. FASES DEL ESTUDIO

El presente estudio se dividió en tres fases.

En la primera de ellas el objetivo era reproducir quirúrgicamente la técnica de exclusión vascular total hepática sobre el animal de experimentación y definir los volúmenes a infundir.

En la segunda fase, una vez comprobada la viabilidad del modelo *in vivo* y definidos los volúmenes a infundir, se plantearon dos modelos quirúrgicos con distinto acceso vascular venoso y velocidad de perfusión para evaluar con cuál de ellos obtendríamos una transferencia génica de mayor calidad.

En la tercera fase, una vez establecido el modelo quirúrgico óptimo para la transferencia génica, se procedió a realizar un nuevo experimento con un gen de interés terapéutico, para valorar la traducción de la proteína, determinando los niveles de la misma en sangre.

### a) **Primera fase**

En esta primera etapa (n=2) se programaron experimentos bajo diferentes condiciones exploratorias de flujo y volumen para definir las circunstancias óptimas: 400 ml a 20 ml/s (n=1) y 600 ml a 60 ml/s (n=1) por las venas porta y cava simultáneamente mediante una conexión en Y.

Sin embargo, dada la exigencia hidrodinámica de estas condiciones, posteriormente se decidió moderar tanto el volumen como la velocidad de la inyección hidrodinámica y se utilizó un volumen fijo de 200 ml (aproximadamente 1/3 del peso del órgano del animal) y flujos de 10 y 20 ml/s. Estos primeros procedimientos, en los que se administró el plásmido por la vena porta y por la vena cava simultáneamente, se les denominó modelo quirúrgico 1 (MQ1).

**b) Segunda fase**

Diseñamos dos nuevos modelos quirúrgicos:

- *Modelo quirúrgico 2 (MQ2)* (n=6). Se planificó la administración del plásmido exclusivamente por la vena cava (vía retrógrada), un volumen de 200 ml a una velocidad de inyección de 10 ml/s (n=3) y 20 ml/s (n=3).
- *Modelo quirúrgico 3 (MQ3)* (n=6). Se planificó la administración del plásmido exclusivamente por la vena porta (vía anterógrada), un volumen de 200 ml a una velocidad de inyección de 10 ml/s (n=3) y 20 ml/s (n=3).

En la segunda etapa se compararon los modelos quirúrgicos 2 y 3 para evaluar la entrega y decodificación del plásmido en el hígado e identificar el mejor modelo quirúrgico para la transferencia génica. Las características de los tres modelos descritos se sintetizan en la Tabla 4.

Grupos de estudio	Acceso venoso	Velocidad de flujo	Volumen
MQ 1 (n=2)	Porta y cava simultáneamente	20 ml/s (n=1)	400 ml
		60 ml/s (n=1)	600ml
MQ 2 (n=6)	Cava	10 ml/s (n=3)	200 ml
		20 ml/s (n=3)	
MQ 3 (n=6)	Porta	10 ml/s (n=3)	200 ml
		20 ml/s (n=3)	

Tabla 4.- Características definitorias de los modelos quirúrgicos. MQ1: Modelo quirúrgico 1. MQ2: Modelo quirúrgico 2. MQ3: Modelo quirúrgico 3

c) **Tercera fase.**

Una vez establecido el modelo óptimo para la transferencia, se procedió a realizar un nuevo experimento (n=4) utilizando la IL-10 como gen terapéutico para medir la entrega, transcripción, traducción de la proteína hIL-10 y la determinación de la misma en plasma a las 24 horas y durante los 10 días posteriores al procedimiento.

En la primera y segunda fase del experimento, fueron sacrificados a las 24 horas del procedimiento quirúrgico e inmediatamente después a su sacrificio se realizó la extracción del hígado y se tomaron biopsias de los distintos lóbulos hepáticos del animal para su posterior análisis.

En la tercera fase del experimento, llevado a cabo el procedimiento quirúrgico, se mantuvo a los animales vivos durante 10 días para poder realizar la medición diaria de la proteína en sangre mediante muestras sanguíneas. El décimo día los animales fueron sacrificados, realizándoseles la hepatectomía para toma de biopsias de los distintos lóbulos del hígado para su posterior análisis.

---

## 5.7. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

A todos los animales de experimentación se les extrajo muestras de sangre (2 ml) justo antes de la inyección del plásmido (preclampaje), 1 hora después de la inyección (postclampaje) y a las 24 horas de la intervención (presacrificio) para medir el nivel de enzimas hepáticas con el objetivo de controlar el daño hepático sufrido durante el procedimiento.

Se determinaron las principales enzimas hepáticas, la transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y la transaminasa glutámico pirúvica (GPT) (cuyos valores normales son de 17 a 31 U/L y de 9 a 47 U/L respectivamente<sup>(104)</sup> por reacciones enzimáticas y espectrofotometría permitiendo así evaluar el posible daño inducido por el procedimiento.

En la tercera fase del experimento se extrajeron muestras sanguíneas del animal desde el día 0 hasta el día 10 antes del sacrificio para medir la proteína hIL-10 en plasma.



## 5.8. MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO Y ACONDICIONAMIENTO

En el modelo quirúrgico 1, se tomó una muestra de cada lóbulo hepático (lóbulo lateral derecho, lóbulo lateral izquierdo, lóbulo medial derecho y lóbulo lateral izquierdo). En los modelos quirúrgicos 2 y 3 se tomaron 2 muestras (proximal y distal) de cada lóbulo hepático para los posteriores análisis (Figura 26).

Las muestras hepáticas representativas (8 por hígado) de los lóbulos principales del hígado fueron aproximadamente de 1 mm de grosor y bajo condiciones estériles, se estabilizaron en solución RNAlater® (Sigma-Aldrich, Madrid-España).

Las muestras se procesaron un día después para el análisis molecular y la evaluación consiguiente de la eficacia de entrega, transcripción y traducción del gen trascurridas 24 horas de la transfección.

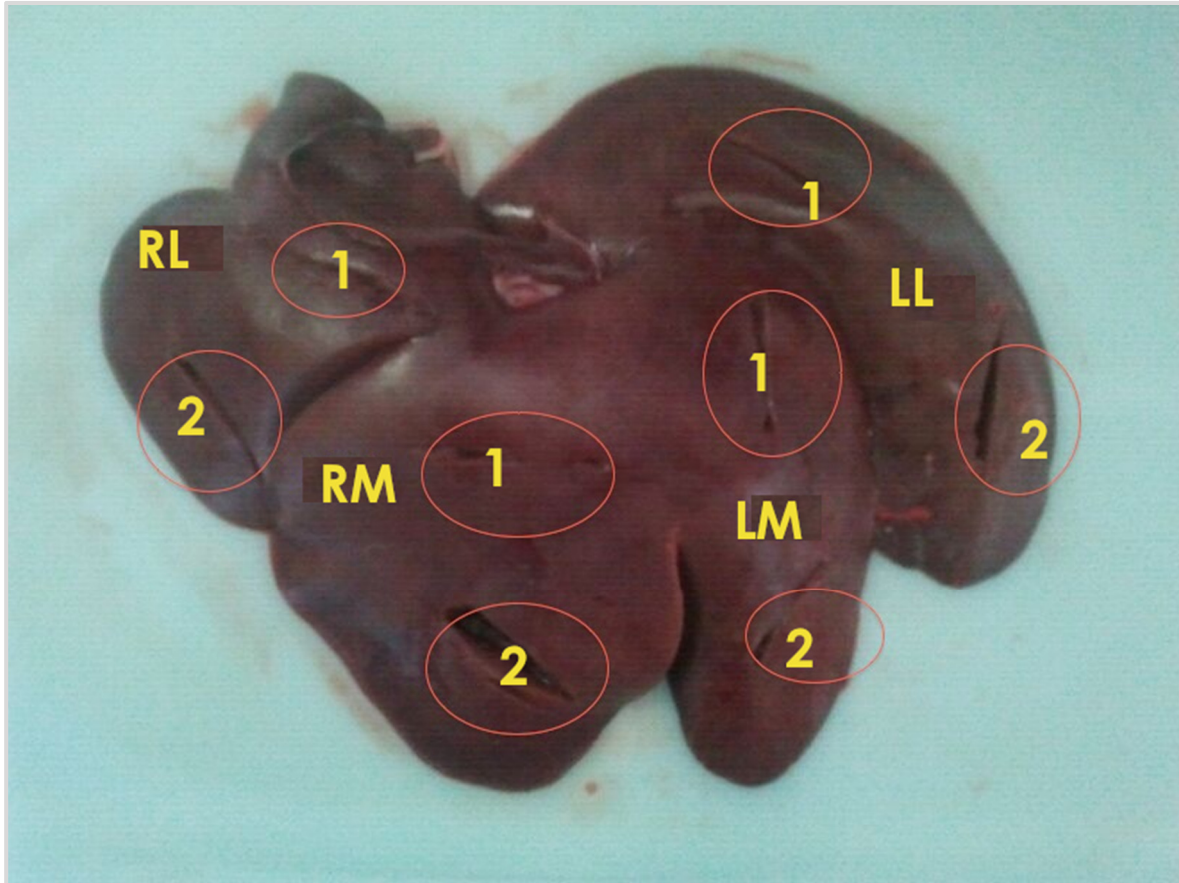


Figura 19.- Toma de muestras del tejido hepático. Áreas del hígado en las que toman muestras: RL= lóbulo; RM=lóbulo medial; LM: lóbulo lateral; LL=lóbulo izquierdo; 1=superior; 2= inferior

En la tercera fase del experimento se tomaron muestras de cada lóbulo hepático al décimo día del procedimiento quirúrgico (en el momento del sacrificio del animal). Y se utilizaron cerdos sanos como controles, en los que se realizaron las mismas técnicas para determinar la entrega y la transcripción del gen hIL-10 y la traducción y la medición de la proteína en sangre.

## 5.9. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ADN Y ARN POR PCR Y RT-PCR

Las muestras hepáticas de los hígados extraídos de los animales de experimentación, se cortaron y homogeneizaron en tampón de homogeneización (Promega®, Barcelona-España) con Ultra-Turrax (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow-Alemania).

La extracción del ADN y el ARN del tejido se llevó a cabo mediante los kits específicos del sistema automatizado Maxwell (Promega®, Barcelona-España). Después de este procedimiento, el ARN y ADN se cuantificaron por espectrofotometría (Nanodrop®, Fischer Scientific, Madrid-España).

### 5.9.1. Determinación de la entrega del gen en el tejido hepático

Para medir la entrega del gen en el tejido hepático (copias de ADN/100 ng ADN total) utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (qPCR) de SYBR GreenPCR Master Mix® (Life technologies, Madrid-España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta técnica es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación del ADN o ARN mensajero de una muestra.

### 5.9.2. Determinación de la transcripción del gen

Para medir la transcripción del gen utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa precedida de la retrotranscripción (RT-PCR). Con estos dos métodos logramos determinar la cantidad de ARN de una muestra mediante una cuantificación relativa. La retrotranscripción con qPCR de ARN a ADNc se llevó a cabo usando 1 µg de ARN total (libre de ADN), hexámeros aleatorios, cebadores específicos y un kit de alta capacidad para la obtención de ADNc (Applied Biosystems).

Para el gen eGFP se utilizaron los siguientes cebadores:

Fw: 5'GTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3', Tm: 53,9°C

Rv: 5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGGG-3', Tm: 54,9°C.

---

Para el gen IL-10, como oligonucleótidos se empleó una premezcla comercial que incluye los cebadores y la sonda TaqMan específica para el gen (codificante) de la interleuquina IL-10 humana (referencia Hs00961622\_m1); Life technologies, Madrid, España). La transcripción del gen se midió en copias de RNA / por célula normalizada.

Los datos cuantitativos se calcularon como el número de copias de gen presente en la solución del ADN extraído y purificado y el número de copias de ARN mensajero del gen eGFP y del gen IL-10 en la de ARN purificado procedente del homogenizado tisular.

El cálculo se puede realizar interpolando el dato de la PCR utilizando una curva estándar preparada con el mismo plásmido utilizado para la transfección. La sensibilidad teórica del procedimiento para la detección del gen eGFP en el ADN es superior a  $10^{-3}$  copias por célula y para el ARN es de 0,02 copias por célula; y para el gen IL-10 es de hasta  $5 \times 10^{-3}$  copias de ADN hIL-10 por célula y  $2 \times 10^{-1}$  copias de ARN hIL-10 por célula.

## 5.10. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA

Las muestras de tejido hepático fueron homogeneizadas con un UltraTurrax (*Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania*) y se purificó la proteína por centrifugación secuencial empleando acetona fría al 80% y etanol al 70%. El extracto proteico se resuspendió en buffer RIPA con inhibidores de proteasa (HEPES 50mM pH: 7.4, NaCl 150mM, EGTA 1mM, NaF 10mM, Nonidet P-40 al 0,5%, sodio ortovanadato 1 mM, leupeptina 10 ug/ml, aprotinina 10 ug/ml, PMSF 100 uM).

Se cuantificó el contenido de proteína total en cada muestra mediante el kit de cuantificación de proteína *NanoOrange protein quantiation kit* (Life Technologies, Madrid-España).

### 5.10.1. Determinación de la proteína eGFP

La cuantificación de la proteína eGFP en las muestras se llevó a cabo mediante un Kit ELISA de alta sensibilidad. El Kit de ELISA se obtuvo de Cells Biolabs (akr-121, San Diego, CA-USA) y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto los anticuerpos como la proteína eGFP recombinante para la preparación de la curva están incluidos. El método western blot no se utilizó por la baja cantidad de la proteína que se esperaba cuantificar.

Posteriormente, se incubaron las muestras en la placa precargada con el anticuerpo de detección anti-GFP y después se añadió el anticuerpo secundario biotinilado en una dilución 1:1000 para una segunda incubación. Tras los lavados correspondientes, se añadió una solución de estreptavidina (1:2000) conjugada con la enzima encargada de la reacción colorimétrica. Después de la incubación y los lavados, se añadió la solución con el sustrato y se leyó la absorbancia de las muestras en la placa a 450 nm.

La curva estándar fue lineal desde 0 a 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 se transformaron a

---

número de moléculas por célula, considerando tanto el peso molecular de la proteína como la cantidad de proteína total presente por célula normalizada en cada muestra individual.

#### 5.10.2. Determinación de la proteína IL-10

El método 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.

Posteriormente, 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 segundo 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.

### 5.11. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS MOLECULARES

Los datos se expresan como 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 tuvo en consideración la siguiente información:

- Para la entrega del gen por célula, se considera 5,4 pg, que es el peso del genoma diploide del cerdo<sup>(105)</sup>.
- Para evaluar la transcripción, se considera 20 pg que es la cantidad total promedio del ARN en un hepatocito mamífero<sup>(106)</sup>.
- Al evaluar la traducción de la proteína por célula, consideramos 500 pg la cantidad total promedio de proteína presente en una célula mamífera<sup>(107)</sup>.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se evaluaron los índices y actividad intrínseca de la proteína. Los índices indican el número de copias de ADN, ARN y proteína por célula normalizada. Estos parámetros se determinaron por cuantificación directa y se transformaron a copias por célula de acuerdo con los criterios mencionados.

Estos índices nos informan del valor cualitativo del procedimiento, sin embargo, hay que mencionar que no traducen la calidad del procedimiento.

- Índice de entrega génica:  
(nº copias ADN gen transferido/pg de ADN total) \*5,4
- Índice de transcripción del gen:  
(nº copias de ARN m gen transferido/pg ARN total) \*20
- Índice de traducción del gen:  
(nº copias de proteína codificada por el gen transferido/pg proteína total) \*500

---

## 5.12. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

La representación gráfica de los datos y el análisis estadístico se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 7® (GraphPad Software, San Diego, CA-USA).

Se utilizó two way-ANOVA para comparar, entre los diferentes grupos, los efectos de velocidad, el flujo y el sentido de la inyección en la eficiencia de la entrega, transcripción y traducción entre los diferentes grupos. Empleamos este test porque comparamos muchas muestras por grupo. En estos casos la distribución se asemeja a la Gaussiana y el test ANOVA se utiliza rutinariamente.

Por el contrario, cuando se comparan los promedios de los distintos grupos independientemente, se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney, siendo éste el más adecuado para un número bajo de muestras con una distribución no Gaussiana.

Para la comparación total de los índices de entrega, transcripción y traducción de la proteína se utilizó un modelo mixto de análisis varianza, que tiene en consideración las medidas repetidas. En la tabla 5 se muestran las variables utilizadas en el estudio.



Variable	Naturaleza de la variable	Escala de medición	Unidad de medida
Tiempo de preparación anestésica	Cuantitativa continua	Razón	Minutos
Periodo de exclusión vascular total/isquemia	Cuantitativa continua	Razón	Minutos
Periodo de incubación	Cuantitativa continua	Razón	Minutos
Periodo post incubación/cierre	Cuantitativa continua	Razón	Minutos
Intervención quirúrgica completa	Cuantitativa continua	Razón	Minutos
Presión arterial sistólica	Cuantitativa continua	Razón	mmHg
Presión arterial diastólica	Cuantitativa continua	Razón	mmHg
Frecuencia cardiaca	Cuantitativa discreta	Intervalo	Lat/min
Saturación de oxígeno	Cuantitativa discreta	Intervalo	%
Alteración del electrocardiograma	Cualitativa dicotómica	Nominal	Sin cambios/alterado
Medición de enzimas hepáticas en sangre	Cuantitativa continua	Intervalo	UI
Expresión de la entrega del gen eGFP en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Copias de ADN del gen eGFP/célula
Expresión de la transcripción del gen eGFP en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Copias de ARN del gen eGFP/célula
Expresión de la traducción de la proteína eGFP en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Proteína eGFP/célula
Expresión de la entrega del gen hIL-10 en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Copias de ADN del gen hIL-10 /célula
Expresión de la transcripción del gen hIL-10 en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Copias de ADN del gen hIL-10 /célula
Expresión de la traducción de la proteína hIL-10 en el tejido hepático	Cuantitativa continua	Razón	Proteína hIL-10/célula
Medición de la proteína hIL-10 en plasma	Cuantitativa continua	Razón	Pg/ml

Tabla 5.- Variables estudiadas

---

## 5.13. DEFINICIONES

### 5.13.1 Plásmido

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN cerradas y de doble hélice, que se caracterizan porque se pueden replicar de forma independiente del ADN genómico <sup>(108)</sup>. Están presentes normalmente en bacterias y en algunas ocasiones en organismos eucarióticos. Cada plásmido tiene por lo menos una secuencia de ADN que sirve como origen de replicación, conteniendo de 2 a 30 genes <sup>(109)</sup>. Los plásmidos utilizados con fines terapéuticos y de prevención poseen tres partes básicas en su conformación: el gen insertado, el gen de resistencia a antibióticos y el origen de replicación. Los plásmidos poseen un interés singular en ingeniería genética por ser uno de los sistemas vectoriales más sencillos, pueden ser fabricados a medida, no matan a la célula y pueden ser muy pequeños. Los plásmidos se pueden utilizar para transferir genes dentro de las células, en el presente trabajo se utilizan dos tipos el p3C-eGFP y el p2F-HIL-10.

### 5.13.2. Promotor

Es una región de ADN que controla el inicio de la transcripción de una determinada porción de ADN a ARN. Por lo tanto, un promotor promueve la transcripción del gen. La región promotora está compuesta por una secuencia específica de ADN localizada justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del ADN y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula.

Existen secuencias promotoras tanto en las células eucariotas como procariontes<sup>(110)</sup>. Hemos utilizado el promotor del CMV ya que es muy eficaz para la transcripción de células en mamíferos.

### 5.13.3 Lugar de restricción

Secuencia de nucleótidos que es reconocida específicamente por una endonucleasa de restricción, esta enzima de restricción es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto (lugar de restricción)<sup>(111)</sup>.

### 5.13.4. Espectrofotometría

Es la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda específicas. Es decir, mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética<sup>(112)</sup>.

### 5.13.5. Exclusión vascular total hepática

Consiste en excluir completamente el flujo vascular del hígado, tanto aferente como eferente. Descrita por Heaney en 1966 y popularizada por Huguet en 1975. Esta técnica produce un trastorno hemodinámico considerable, con descenso del retorno venoso y aumento de las resistencias periféricas, por lo que sólo debe realizarse de forma programada y no como método de urgencia<sup>(113)</sup>.

### 5.13.6. Periodo de incubación

Es el periodo transcurrido entre el inicio de la perfusión del plásmido y la finalización de la exclusión vascular total hepática.

### 5.13.7. Periodo de postincubación

Es el periodo transcurrido entre la finalización de la exclusión vascular total y el cierre de la laparotomía media realizada.

### 5.13.8. Transfección

Se usa el término transfección para denominar la entrada de ADN foráneo a las células eucariotas mediante métodos químicos o físicos. Las técnicas de

---

transfección celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares<sup>(114)</sup>.

#### 5.13.9. Absorbancia

También conocida como densidad óptica (OD), se define como la relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra.

#### 5.13.10. Reacción colorimétrica

La colorimetría es la ciencia que estudia la medida de los colores y desarrolla métodos para la cuantificación del color, es decir la obtención de valores numéricos del color. Es un procedimiento de análisis químico basado en la intensidad de color de las disoluciones.

#### 5.13.11. Actividad intrínseca

La actividad intrínseca o eficacia se refiere a la capacidad relativa de un complejo fármaco-receptor para producir una respuesta funcional máxima. Debe distinguirse de la afinidad, que es una medida de la capacidad del fármaco para unirse a su diana molecular.

#### 5.13.12. Reacción en cadena de polimerasa

Es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad viene determinada porque tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una probabilidad muy alta, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas o realizar investigación científica sobre el ADN amplificado<sup>(115)</sup>.

#### 5.13.13. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Este método, además de permitir la amplificación específica del ADN, cuantifica la expresión génica de una muestra en tiempo real<sup>(116)</sup>.

#### 5.13.14. Retrotranscripción

Es un proceso de la biología molecular que implica la generación de una cadena de ADN de doble cadena a partir de ARN de cadena simple.

#### 5.13.15. Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa

Es una de las variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Se utiliza habitualmente en biología molecular para detectar la expresión del ARN. Una hebra de ARN se retrotranscripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada *transcriptasa inversa* y el resultado se amplifica en una PCR tradicional. Es una técnica altamente sensible en la que un número muy bajo de copias de moléculas de ARN puede ser detectado<sup>(117)</sup>.



# Resultados

---





## 6. RESULTADOS

### 6.1. DESARROLLO DEL MODELO QUIRÚRGICO

Con el animal en decúbito supino y sujeto de las cuatro patas, previa asepsia y antisepsia y colocación de campos estériles, se realizó una laparotomía supra e infraumbilical exponiendo todas las estructuras intraabdominales (Figura 20).

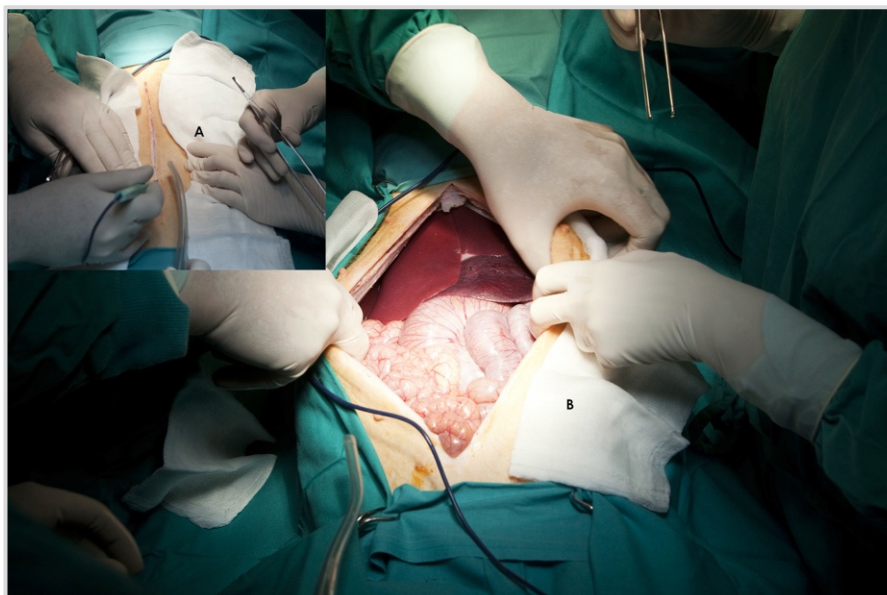


Figura 20.- Laparotomía y exposición de estructuras

Se movilizó el mesenterio intestinal hacia la izquierda para desplazar las asas intestinales e identificar la vena porta en su porción extrahepática, que se diseccionó y referenció con una cinta de goma en sus extremos distal y proximal para crear un segmento cerrado a través del cual pudiéramos canular la vena. Se realizó el mismo procedimiento en la vena cava inferior por encima de las venas renales, colocando una o dos cintas de goma dependiendo del modelo a seguir.

Se abordó el hilio hepático y se identificó la arteria hepática, referenciándola con una ligadura de seda 3/0 (Ethicon™) (Figura 21).

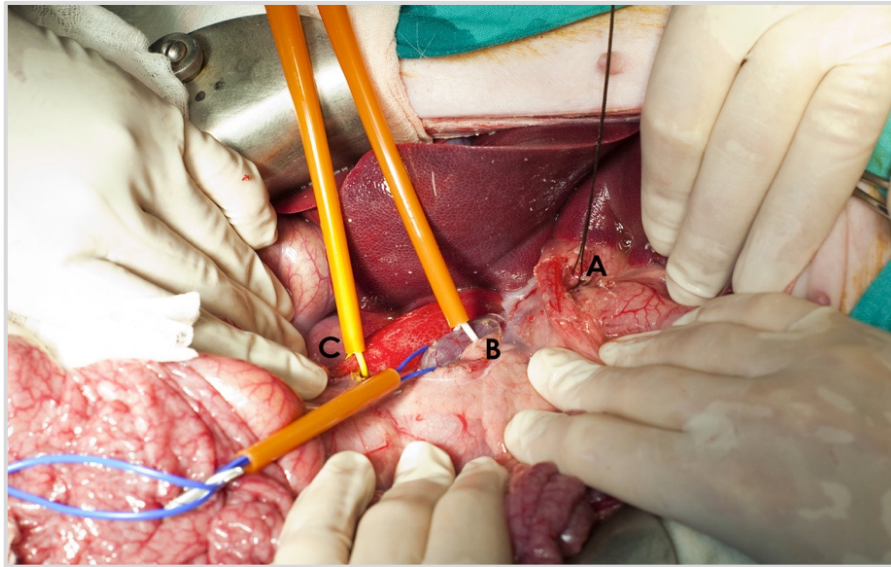


Figura 21.- A) Arteria hepática. B) Vena porta. C) Vena cava inferior

Por último, se identificaron, disecaron y seccionaron los ligamentos hepáticos para visualizar las venas suprahepáticas y referenciarlas con una cinta de goma (Figura 22).

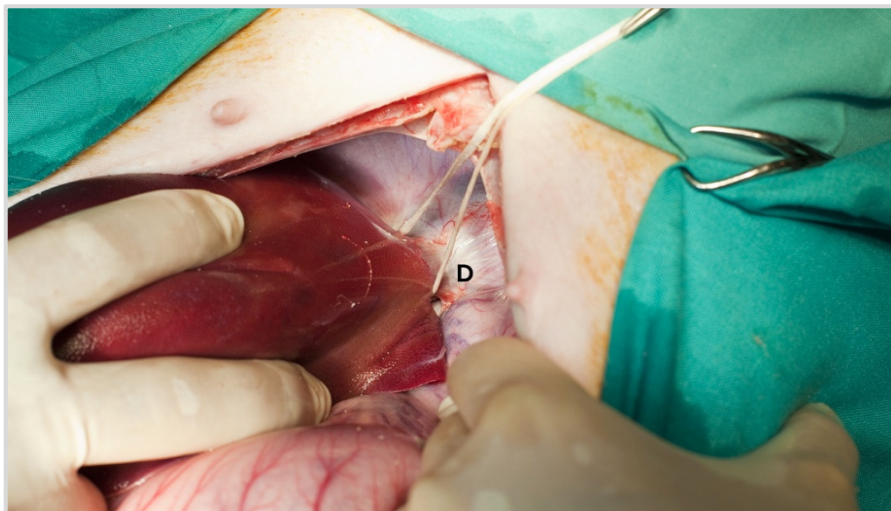


Figura 22.- D) Vena cava porción suprahepática

### 6.1.1. Modelo quirúrgico 1

En el modelo quirúrgico 1, una vez identificadas y referenciadas todas las estructuras vasculares, procedimos a realizar el clampaje de las estructuras vasculares con dispositivos de torniquete y la arteria hepática con un clamp vascular. El orden de clampaje se realizó de la siguiente forma: primero la arteria hepática, seguido de

la vena porta, a continuación, la vena cava inferior por encima de las venas renales y por último la vena cava inferior en su segmento suprahepático, consiguiendo así una exclusión hepática vascular total. Se realizó una incisión en la cara anterior de la vena cava y otra en la cara anterior de la vena porta, entre las dos cintas de goma colocadas. Se colocó una cánula de perfusión de 14F (Bicakcilar™, Turkey) dentro de cada vena (Figura 23).

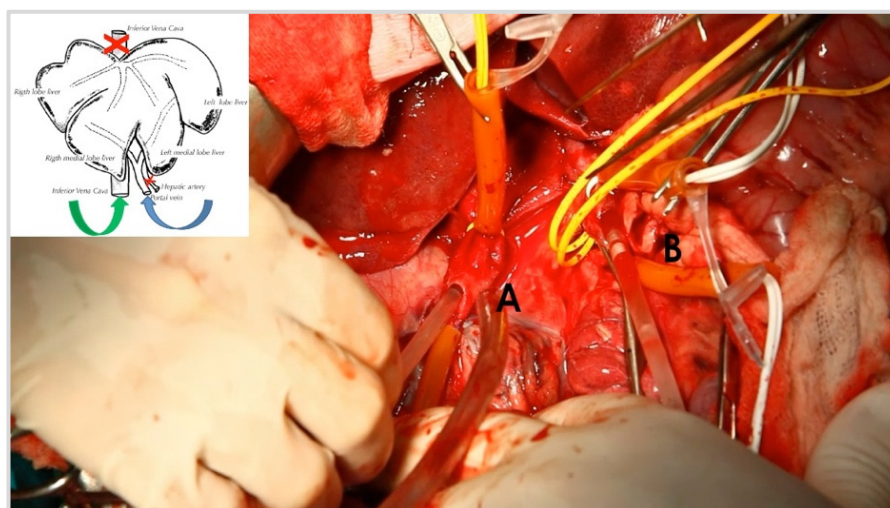


Figura 23.- Modelo quirúrgico 1: inyección hidrodinámica por ambas venas. A. Cánula en la vena cava inferior porción infrahepática. B. Cánula en la vena porta

En un animal se realizó la perfusión con una velocidad de 20 ml/s y en otro a 60 ml/s con un volumen de 400 ml y 600 ml respectivamente.

Una vez terminada la perfusión de la solución, retiramos las cánulas manteniendo ocluidas las venas. El hígado permaneció excluido vascularmente durante 5 minutos, con lo que conseguimos un aumento de la presión intrahepática para permitir el paso de la solución al interior del hepatocito (periodo de incubación). Durante este tiempo, las incisiones previamente realizadas, en las venas cava y porta fueron suturadas con puntos sueltos de Biosyn 5/0 (Covidien™) para la vena cava y Prolene 6/0 (Ethicon™) para la porta. Las suturas se realizaron transversalmente, con la finalidad de no ocasionar una estenosis vascular postquirúrgica.

Al terminar las suturas vasculares procedimos a realizar el desclampaje, de forma progresiva e inversa al cierre de las estructuras vasculares, empezando primero

por la vena cava inferior suprahepática y continuando por la vena cava inferior infrahepática, vena porta y arteria hepática, en ese orden. Se comprobó la hemostasia y se procedió a realizar el cierre de la laparotomía (periodo postincubación) con Dexon 2/0 (Covidien™)

### 6.1.2. Modelo quirúrgico 2

En el modelo quirúrgico 2, una vez identificadas y referenciadas todas las estructuras vasculares, procedimos a realizar el clampaje de las estructuras vasculares con dispositivos de torniquete y la arteria hepática con un clamp vascular. El orden de clampaje seguido fue el siguiente: primero la arteria hepática, seguido de la vena porta, a continuación, la vena cava inferior por encima de las venas renales y por último la vena cava inferior en su segmento suprahepático, consiguiendo así una exclusión hepática vascular total. Se realizó una incisión en la cara anterior de la vena cava entre las dos cintas de goma colocadas y se colocó una cánula de perfusión de 14F (Bicakcilar™, Turkey) dentro de la vena (Figura 24).

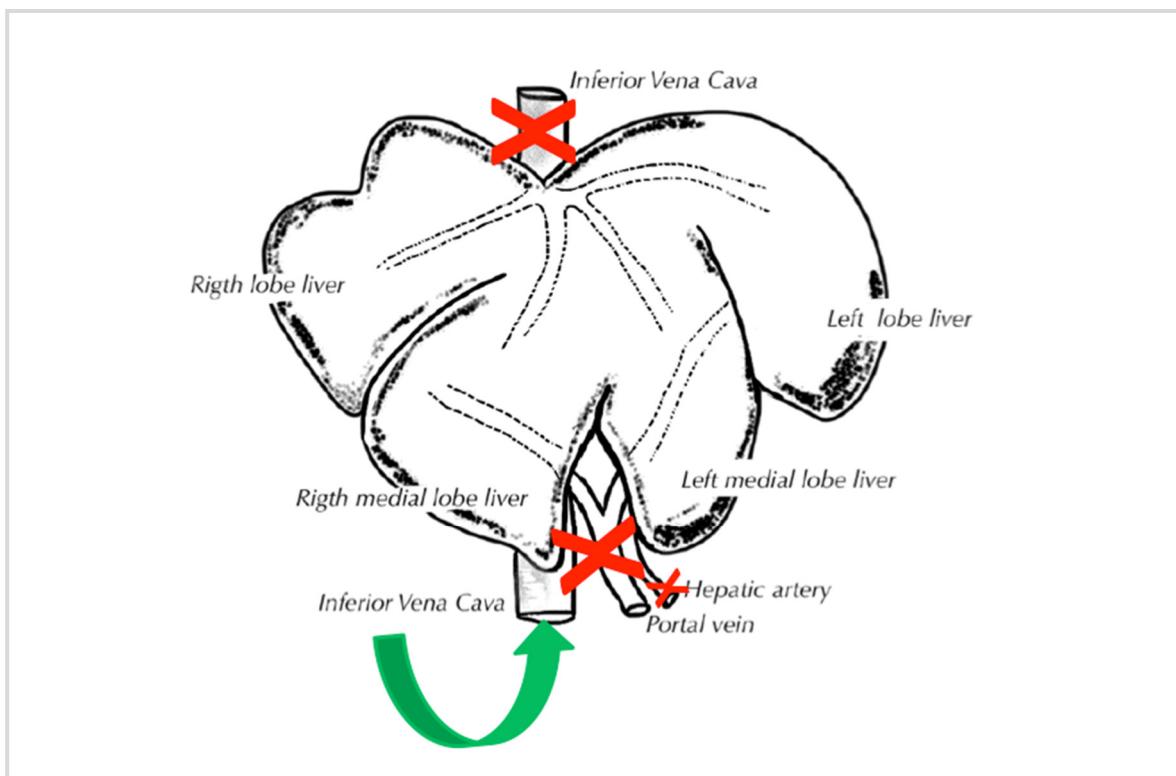


Figura 24.- Modelo quirúrgico 2: Inyección hidrodinámica por la vena cava o vía retrógrada

En tres animales se realizó la perfusión con una velocidad de flujo de 10 ml/s y en otros tres animales con una velocidad de flujo de 20 ml/s con un volumen de 200 ml en todos ellos. Una vez terminada la perfusión de la solución (periodo de incubación), retiramos la cánula de la vena cava con lo que el hígado permaneció excluido vascularmente durante 5 minutos.

Durante este tiempo, la incisión realizada en la vena cava fue suturada con puntos sueltos de Biosyn 5/0 (Covidien™). Al concluir la sutura vascular procedimos a realizar el desclampaje, de forma progresiva e inversa al cierre de las estructuras vasculares, empezando primero por la vena cava inferior suprahepática y continuando por la vena cava inferior infrahepática, vena porta y arteria hepática. Se comprobó la hemostasia y se procedió a realizar el cierre de la laparotomía (periodo de postincubación) con Dexon 2/0 (Covidien™).

### 6.1.3. Modelo quirúrgico 3

En el modelo quirúrgico 3, una vez identificadas y referenciadas todas las estructuras vasculares, realizamos el clampaje de las estructuras vasculares con dispositivos de torniquete y la arteria hepática con un clamp vascular. El orden de clampaje fue el siguiente: primero la arteria hepática, seguido por la vena porta, a continuación la vena cava inferior por encima de las venas renales y por último la vena cava inferior en su segmento suprahepático, consiguiendo así una exclusión hepática vascular total. Se realizó una incisión en la cara anterior de la vena porta entre las dos cintas de goma y se colocó una cánula de perfusión de 14 F (Bicakcilar™, Turkey) dentro de la vena porta (Figura 25).



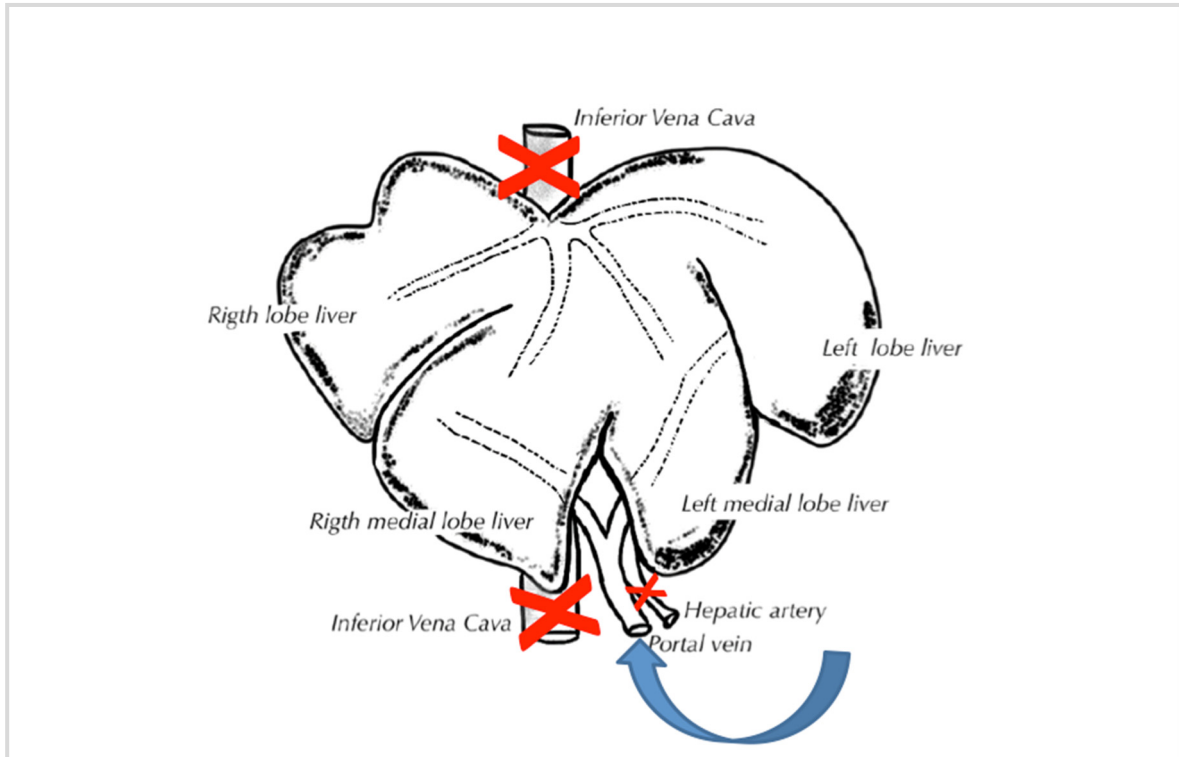


Figura 25.- Modelo quirúrgico 3: inyección hidrodinámica por vena porta o vía anterógrada

En tres animales se realizó la perfusión con una velocidad de flujo de 10 ml/s y en otros tres animales se realizó la perfusión con una velocidad de flujo de 20 ml/s, ambos con un volumen de 200 ml. Una vez terminada la perfusión de la solución (periodo de incubación), retiramos la cánula, el hígado permaneció excluido vascularmente durante 5 minutos para permitir el paso de la solución al interior del hepatocito.

Durante este tiempo, la incisión realizada en la vena porta fue suturada con puntos sueltos de Prolene 6/0 (Ethicon™). Al terminar la sutura vascular procedimos a realizar el desclampaje, que fue progresivo e inverso al cierre de las estructuras vasculares, empezando primero por la vena cava inferior suprahepática y continuando por la vena cava inferior infrahepática, vena porta y arteria hepática (periodo de postincubación).

Se comprobó la hemostasia y se realizó el cierre de la laparotomía con Dexon 2/0 (Covidien™) (Figura 26).

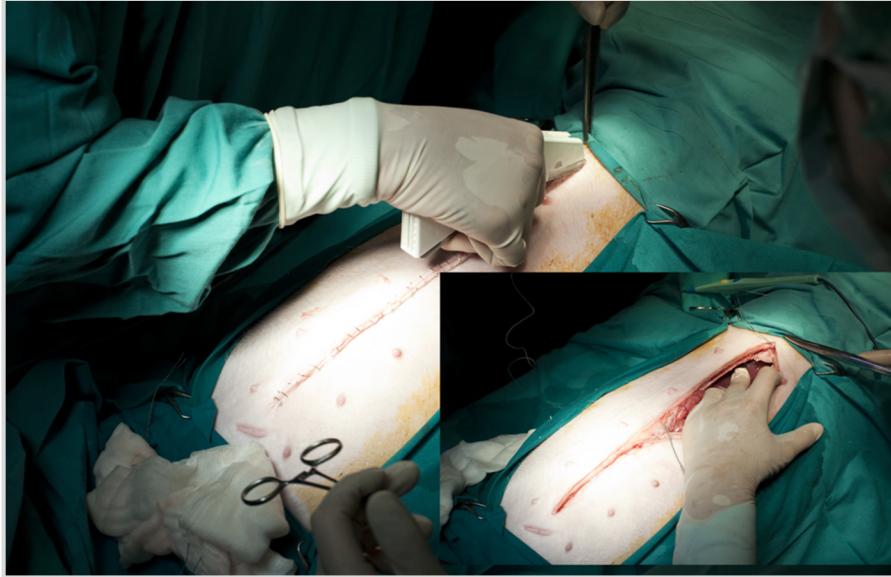


Figura 26.- Cierre de laparotomía media

Los animales, una vez recuperados de la anestesia, se mantuvieron con analgesia postoperatoria y recibieron los cuidados necesarios. Todos los animales fueron sacrificados usando 20 mEq de cloruro potásico iv (Braun<sup>TM</sup> 2 ampollas).

---

## 6.2. PROCEDIMIENTO DE TRANSFERENCIA

Es importante realizar con éxito este procedimiento de transferencia génica en animales anatómicamente parecidos al humano para poder acercarnos más a la situación clínica y poder extrapolar, con más fidelidad, el procedimiento.

Esta técnica se ha desarrollado en animales pequeños como el ratón en donde la solución génica es inyectada a través de la vena de la cola llegando así a la circulación hepática y al hepatocito. Intentando desarrollar este procedimiento de una manera más selectiva se decidió realizar un asilamiento vascular hepático completo en el cerdo *in vivo*; y así poder inyectar la solución génica. Esta técnica ha quedado explicada paso a paso con detalle en el apartado de material y métodos.

Distintos estudios realizados anteriormente evidenciaron la necesidad de crear un ambiente adecuado para la perfusión de la solución, es por ello que decidimos iniciar los experimentos utilizando un volumen de aproximadamente un tercio del peso del hígado de un cerdo, basado en el peso del órgano en un cerdo de 20 kg, y siendo éste de aproximadamente 600 g.

Con esta primera fase del trabajo, realizamos experimentos inyectando simultáneamente por las venas cava y porta con una conexión en Y con una velocidad de perfusión de 20 ml/s y un volumen de 400 ml; y una velocidad de 60 ml/s y un volumen de 600 ml.

Tras realizar esta primera fase establecimos, según los resultados obtenidos, una velocidad de perfusión de 10 ml/s y 20 ml/s y en lugar de perfundir por vena porta y cava simultáneamente, decidimos realizarlo por separado.

### 6.2.1. Tiempo del procedimiento quirúrgico

Este procedimiento quirúrgico requiere menos de 60 minutos para su realización y el periodo de exclusión vascular total completa es inferior a los 10



minutos. Las medias de los tiempos quirúrgicos en las distintas fases del procedimiento se reflejan en la tabla 6.

Fase quirúrgica	Media del tiempo empleado en minutos (DE)
Preparación anestésica	28,7 (8,9)
Periodo de exclusión vascular total/isquemia	7,8 (1,9)
Periodo de incubación tras la inyección hidrodinámica	4,6 (0,7)
Periodo postincubación o cierre	12,7 (3,7)
Intervención completa	49,4 (11,8)

Tabla 6.- Tiempos del procedimiento quirúrgico

---

### 6.3. RESULTADOS DEL MODELO QUIRÚRGICO 1 (*PERFUSIÓN POR VENA CAVA Y PORTA A UNA VELOCIDAD DE 20 ml/s Y 60 ML/S CON UN VOLUMEN DE 400 Y 600 ml RESPECTIVAMENTE.*)

Esta primera fase del trabajo se centra en evaluar la mejor forma para que el gen pueda entrar en la célula y se exprese.

#### 6.3.1. Parámetros hemodinámicos

Los animales fueron permanentemente monitorizados durante el procedimiento, evaluando las funciones vitales y las posibles diferencias durante la exclusión vascular total hepática y la inyección de la solución.

En la tabla 7 se representan diferentes parámetros hemodinámicos de los animales durante el procedimiento como la presión arterial sistólica y diastólica, la frecuencia cardiaca, la presión parcial de oxígeno y la presencia de cambios morfológicos en el electrocardiograma. Estas medidas se tomaron en distintas fases del procedimiento: basal (antes de la intervención), pre-inyección (tras la exclusión vascular antes de la inyección del gen), inyección (al momento de inyectar el gen) y reperfusión (tras abrir todos los torniquetes y clamps). Esta última fase la medimos en minutos.

Los valores medios de la presión arterial basal de los animales fueron de 92,8 (10) mmHg para la presión arterial sistólica y 63,2 (9,9) mmHg para la presión arterial diastólica. La exclusión vascular total condiciona un marcado descenso en la presión arterial del animal, alrededor de un 50%, que revierte parcialmente con la inyección de la solución y se normaliza al minuto de la revascularización.

No se observaron cambios en el electrocardiograma y la saturación de oxígeno se mantuvo permanentemente en valores por encima del 98%.

Modelo quirúrgico 1 (n=2)	Presión arterial sistólica media (DE) (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Frecuencia cardiaca (rango) (lat/min)	Saturación de Oxígeno (%)	EKG
Basal	92,8 (10)	63,2 (9,9)	58 – 60	> 98%	Sin cambios
<b>Exclusión vascular total hepática</b>					
Preinyección	46,9 (10)	37 (6,2)	85 - 88	> 98%	Sin cambios
Inyección	59,7 (5,6)	43,8 (4,3)	80 - 84		
<b>Revascularización</b>					
0 minuto	40,7 (5)	31,3 (4)	89 - 95	> 98%	Sin cambios
1 minuto	77,7 (15,9)	53,3 (10,3)	75 - 80		
2 minutos	83,3 (12,6)	57 (6,3)	74 - 78		
3 minutos	82,5 (20,9)	60,2±22,3	72 - 75		
5 minutos	85,7 (7,1)	56 (4)	70 - 74		
10 minutos	93,8 (5,5)	59,2 (2)	60 - 63		

Tabla 7.- Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 1

### 6.3.2. Toxicidad hepática

Para evaluar si el proceso de hidrofección podía causar algún daño hepático se determinaron las enzimas hepáticas mediante muestras sanguíneas periféricas, en la hora 0 (antes de realizar la exclusión vascular hepática total), una hora después y a las 24 horas del procedimiento.

Se determinaron en sangre concentraciones de GOT y GPT (UI). Los resultados se muestran en la tabla 8. Evidenciamos que el procedimiento causa una elevación de la GOT al doble de su valor normal en la primera hora después del procedimiento y al triple a las 24 horas del procedimiento con la velocidad de

perfusión de 60ml/s. Con la velocidad de perfusión 20 ml/s existe una leve elevación de la GOT pero que se normaliza a las 24 horas. Los niveles plasmáticos de GPT se mantienen inalterados durante las 24 horas posteriores a la hidrofección.

Enzima	Periodo de toma de muestra (horas)	Velocidad de perfusión	
		20 ml/s (n=1)	60 ml/s (n=1)
GOT (UI)	0	38	55
	1	74	107
	24	36	151
GPT (UI)	0	29	34
	1	34	38
	24	31	57

Tabla 8.- Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 1. (Valores normales GOT: 17-55UI GPT: 9-46 UI)

### 6.3.3. Entrega aparente del gen al tejido hepático

La cuantificación de la expresión génica mediante qPCR indicó que la entrega aparente del gen con una velocidad de flujo de 20 ml/s osciló en un rango de 0,5 a 2,46 eGFP ADN copias/célula normalizada en cada lóbulo hepático mientras que con la tasa de flujo de 60 ml/s el rango osciló entre 0,016 y 0,068 eGFP ADN copias/célula normalizada, tal y como se muestra en la figura 27. Utilizamos el concepto de entrega aparente porque no se puede saber con total seguridad si todas las copias del gen han alcanzado el interior de la célula.

Estos datos indican que una mayor cantidad de plásmido fue capturado en el tejido hepático cuando la inyección se realizó a 20 ml/s. La entrega de genes fue mayor en el lóbulo medial izquierdo en ambas velocidades de infusión.

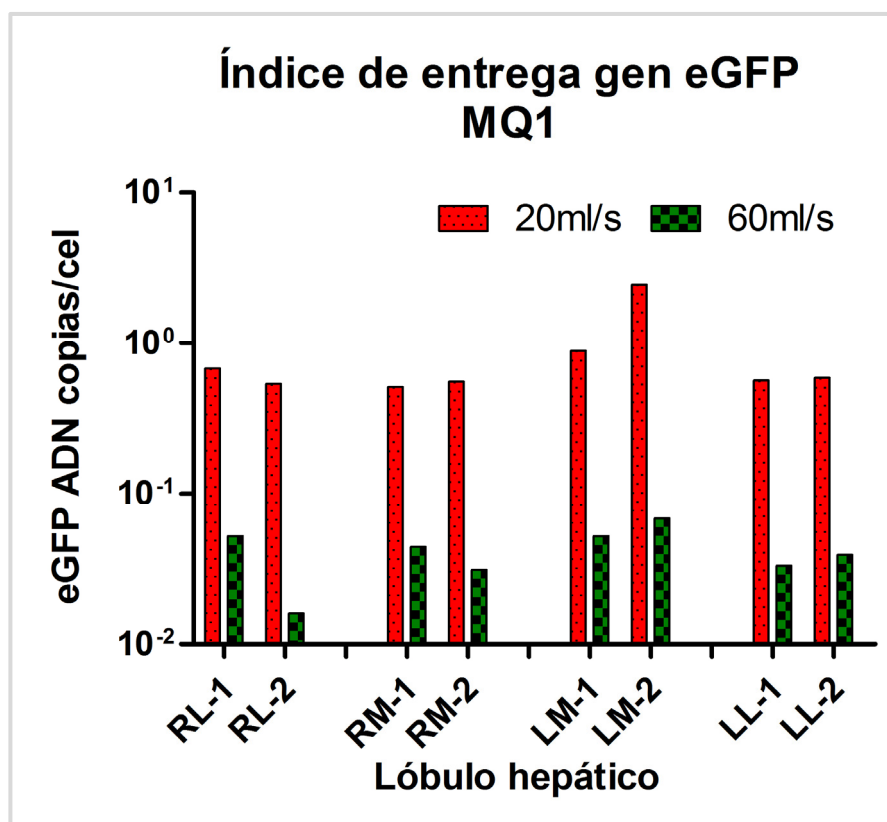


Figura 27.- Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena cava y Porta simultáneamente (MQ1) a distintas velocidades y volúmenes

#### 6.3.4. Transcripción del gen al tejido hepático

El índice de transcripción del gen, con una velocidad de flujo de 20 ml/s osciló en un rango entre 2,108 y 4,95 eGFP ARN copias/célula normalizada en cada lóbulo hepático y con la tasa de flujo de 60 ml/s fue de 1,485-15,293 eGFP ARN copias/célula normalizada como se muestra en la figura 28.

Los resultados no mostraron diferencias relevantes en la transcripción génica con las distintas velocidades de inyección.

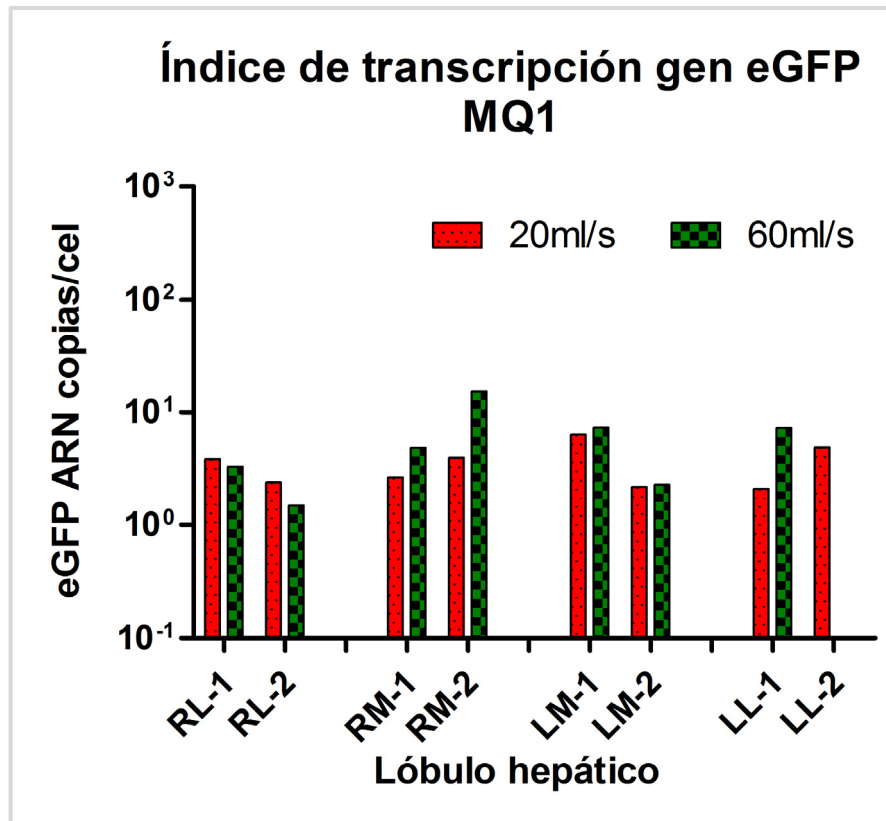


Figura 28.- Índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena porta y cava simultáneamente (MQ1) a distintas velocidades y volúmenes.

## 6.4. RESULTADOS DEL MODELO QUIRÚRGICO 2 (*PERFUSIÓN POR VENA CAVA A UNAS VELOCIDADES DE 10 Y 20 ml/s Y CON UN VOLUMEN DE 200 ml*)

### 6.4.1. Parámetros hemodinámicos

Los parámetros hemodinámicos medidos en el procedimiento fueron presión sistólica y diastólica, frecuencia cardiaca, saturación de oxígeno y cambios morfológicos en el electrocardiograma. Estos valores están representados en la tabla 9.

Modelo quirúrgico 2 (n=6)	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Presión Arterial Diastólica (mmHg)	Rango Frecuencia Cardiaca (lat/min)	Saturación de Oxígeno (%)	EKG
Basal	87,3 (9,2)	60,8 (6,4)	50-60	> 98%	Sin cambios
<b>Exclusión vascular total hepática</b>					
Preinyección	49,5 (3,8)*	39,5 (4,8)**	80-90	> 98%	Sin cambios
Fin de la inyección	62,5 (3,1)**	46,3 (3,0)	75-80		
Pre-reperusión	42,0 (5,6)*	33,3 (3,8)**	80-95		
<b>Revascularización</b>					
1 minuto	75,5 (21,9) <sup>aa</sup>	53,5 (20,5)	70-80	> 98%	Sin cambios
2 minutos	81,7 (14,6) <sup>aaa</sup>	57,0 (11,8) <sup>a</sup>	70-80		
3 minutos	80,7 (32,3) <sup>aaa</sup>	67,0 (36,4) <sup>aa</sup>	65-75		
5 minutos	83,0 (4,2) <sup>aaa</sup>	51,0 (1,4)	60-70		
10 minutos	95,5 (4,9) <sup>aaa</sup>	59,5 (2,1)	55-65		

Tabla 9.- Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 2. \*= $p < 0.0001$  vs. Basal; \*\*= $p < 0.01$ ; <sup>a</sup>= $p < 0.01$ ; <sup>aa</sup>= $p < 0.001$  vs. Pre-reperusión; <sup>aaa</sup>= $p < 0.05$

#### 6.4.2. Toxicidad hepática

Para evaluar si el proceso de hidrofección causa algún daño hepático se determinaron las enzimas hepáticas, mediante muestras sanguíneas periféricas, antes de realizar la exclusión vascular hepática total, una hora después y a las 24 horas del procedimiento.

Se determinan en sangre las concentraciones de GOT y GPT (UI). Los resultados se muestran en la tabla 10. El procedimiento ocasionó una elevación de la GOT al doble de su valor normal en la primera hora después del procedimiento, normalizándose a las 24 horas. Los niveles plasmáticos de GPT se mantuvieron inalterados durante las 24 horas posteriores a la hidrofección.

Enzima	Tiempo toma de muestra (horas)	Modelo quirúrgico 2: Perfusión por vena cava (n=6)
GOT (UI)	0	39,2 (10,6)
	1	72,4 (29,9)
	24	37,4 (11,5)
GPT (UI)	0	30,4 (4,5)
	1	32,8 (3,4)
	24	36,8 (7,8)

Tabla 10.- Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 2. (Valores normales GOT: 17-55UI GPT: 9-46 UI)

#### 6.4.3. Mortalidad del procedimiento

Un animal falleció a las 20 horas del procedimiento quirúrgico sin hallar causa que lo justificara en la autopsia. No fue incluido en el estudio ya que no se pudieron realizar las mediciones correspondientes.

#### 6.4.4. Entrega aparente del gen al tejido hepático

En la figura 29 se muestra la entrega aparente del gen eGFP al tejido hepático en las muestras tomadas de los distintos lóbulos hepáticos. Se compara, en el modelo



quirúrgico 2, la velocidad de perfusión del gen eGFP. En el gráfico de la izquierda se muestra el índice de entrega a una velocidad de 10 ml/s y en el de la derecha a 20 ml/s, ambos con un volumen de 200ml. Los índices de entrega aparente del gen se expresan en copias gen eGFP por célula normalizada promedio. El gráfico muestra como la entrega resulta más eficiente cuando se realiza a una velocidad de 10 ml/s.

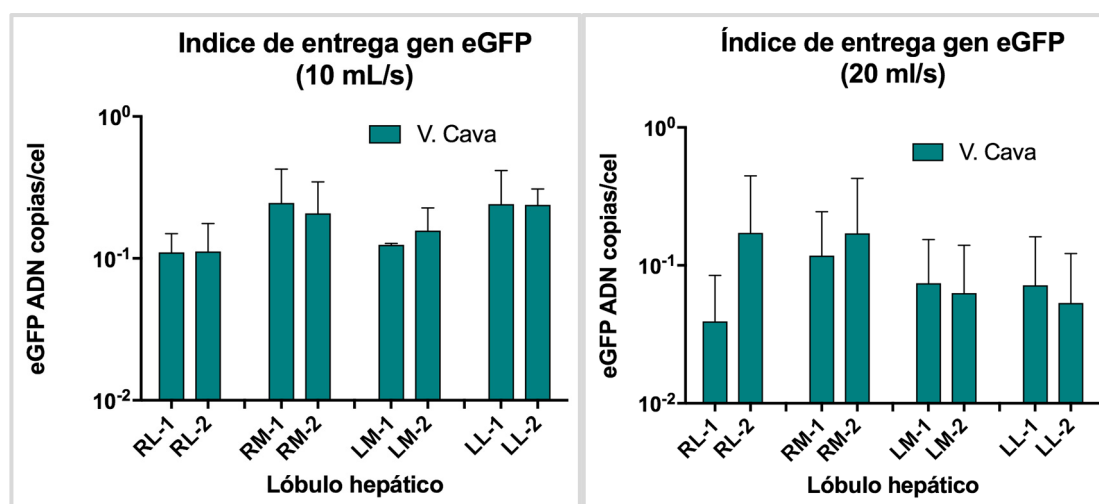


Figura 29.- El gráfico de la izquierda muestra las medias del índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena cava (MQ2) a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml y el gráfico de la derecha muestra las medias del Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por Vena Cava (MQ2) a una velocidad de 20 ml/s.

#### 6.4.5. Transcripción del gen al tejido hepático

En la figura 30, se muestra el índice de transcripción a distintas velocidades realizadas en el modelo quirúrgico 2. A la izquierda se muestra el índice de transcripción de cada zona del hígado tras la perfusión de eGFP a 10 ml/s y a la derecha a 20 ml/s. Los índices de transcripción se expresan como número de copias de ARN del gen eGFP por célula normalizada. Aparentemente no existe ninguna diferencia entre las distintas velocidades hasta que se observa que a 20 ml/s en la muestra del lóbulo medial existe una transcripción de casi 100 veces superior a la perfundida a 10 ml/s ( $p < 0,001$ ).

Observamos cómo la transcripción resulta homogénea a lo largo del hígado para los dos modelos con diferentes velocidades.

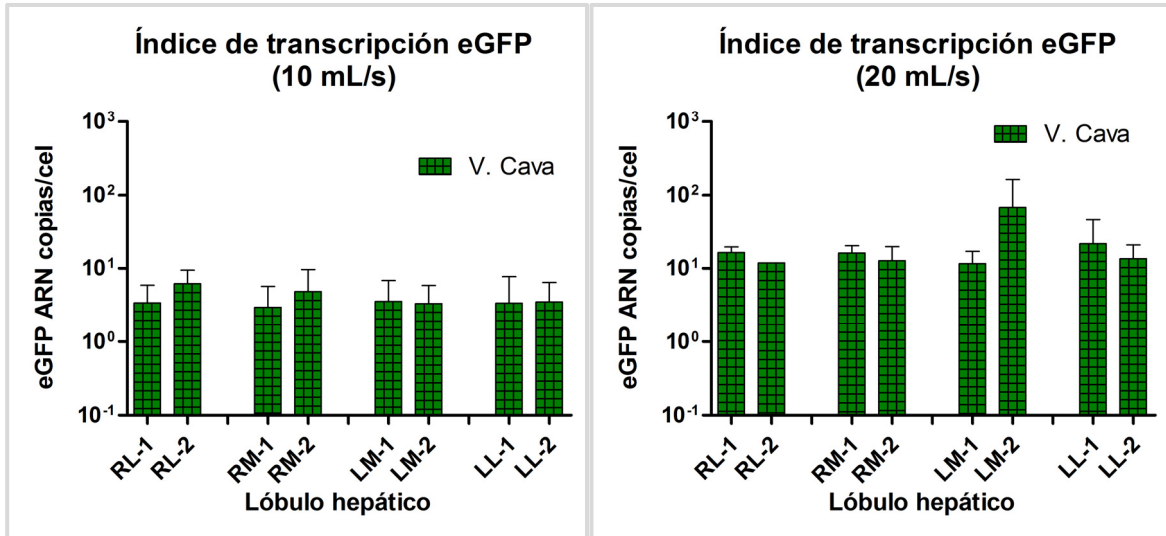


Figura 30.- El grafico de la izquierda muestra las medias del índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena cava (MQ2) a una velocidad de perfusión de 10 ml/s y con un volumen de 200ml. El grafico de la derecha muestra las medias del índice de la transcripción del gen eGFP al tejido hepático por la vena cava (MQ2) a una velocidad de perfusión de 20 ml/s con un volumen de 200ml.

## 6.5. RESULTADOS DEL MODELO QUIRÚRGICO 3 (PERFUSIÓN POR VENA PORTA A UNAS VELOCIDADES DE 10 Y 20 ml/s Y CON UN VOLUMEN DE 200 ml)

### 6.5.1. Parámetros hemodinámicos

Los parámetros hemodinámicos medidos en el procedimiento fueron presión sistólica y diastólica, frecuencia cardiaca, saturación de oxígeno y cambios morfológicos en el electrocardiograma. Estos valores están representados en la tabla 11.

Modelo quirúrgico 3 (n=6)	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Presión Arterial Diastólica (mmHg)	Rango Frecuencia Cardiaca (lat/min)	Saturación de Oxígeno (%)	EKG
Basal	98,3 (7,9)	65,5 (13,4)	50-60	> 98%	Sin cambios
<b>Exclusión vascular total hepática</b>					
Preinyección	44,3 (13,8)*	34,5 (7,1)*	80-90	> 98%	Sin cambios
Fin de la inyección	54,0 (5,7)*	39,0 (1,4)***	75-80		
Pre-reperusión	39,3 (5,1)*	29,3 (5,1)*	80-95		
<b>Revascularización</b>					
1 minuto	82,0 (0,0) <sup>a</sup>	53,5 (20,5)	70-80	> 98%	Sin cambios
2 minutos	90,0 (10,0) <sup>aa</sup>	57,0 (0,0)	70-80		
3 minutos	84,3 (6,7) <sup>aa</sup>	53,3 (2,5) <sup>aaa</sup>	65-75		
5 minutos	86,8 (8,1) <sup>aa</sup>	58,0 (6,3) <sup>a</sup>	60-70		
10 minutos	93,0 (6,2) <sup>aa</sup>	59,0 (2,7) <sup>a</sup>	55-65		

Tabla 11.- Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 3. \* =p<0,001 vs basal; \*\*\* =p<0,05; <sup>a</sup>=p<0,01; <sup>aa</sup> =p<0,001vs pre-reperusión; <sup>aaa</sup> =p<0,05

### 6.5.2. Toxicidad hepática

Para evaluar si el proceso de hidrofección causa algún daño hepático se determinaron las enzimas hepáticas mediante muestras sanguíneas periféricas antes de realizar la exclusión vascular hepática total, una hora después y a las 24 horas del procedimiento.

Se determinaron en sangre concentraciones de GOT y GPT (UI). Los resultados se muestran en la tabla 12. El procedimiento causó una elevación de la GOT al doble de su valor normal en la primera hora después del procedimiento, sin llegar a normalizar a las 24 horas del procedimiento. Los niveles plasmáticos de GPT se mantuvieron inalterados durante las 24 horas posteriores a la hidrofección.

Enzima	Tiempo toma de muestra (horas)	Modelo quirúrgico 3: perfusión por V. porta (n=6)
GOT (UI)	0	40,7 (13,2)
	1	91,7 (16,6)
	24	82,3 (60,7)
GPT (UI)	0	29,7 (4,0)
	1	35,3 (2,3)
	24	41,0 (14,0)

Tabla 12.- Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 3. (Valores normales GOT: 17-55UI GPT: 9-46 UI)

### 6.5.3. Mortalidad del procedimiento

Un animal falleció al iniciar el procedimiento quirúrgico sin causa aparente que lo justificara durante la intervención quirúrgica. No fue incluido en el estudio ya que no se pudieron realizar las mediciones correspondientes.

### 6.5.4. Entrega aparente del gen al tejido hepático

En la figura 31 se muestra el índice de entrega aparente del gen eGFP en las distintas muestras tomadas el hígado del cerdo. Se comparan en el modelo quirúrgico

3 las diferentes velocidades utilizadas. A la izquierda se muestra el índice de entrega del gen a 10 ml/s y a la derecha a 20 ml/s. Los índices de entrega se expresan como número de copias de ADN del gen eGFP por célula. Los gráficos nos muestran cómo la entrega resulta más eficiente cuando la inyección se llevó a cabo a menor velocidad (10 ml/s). La entrega también fue muy homogénea en todas las muestras analizadas.

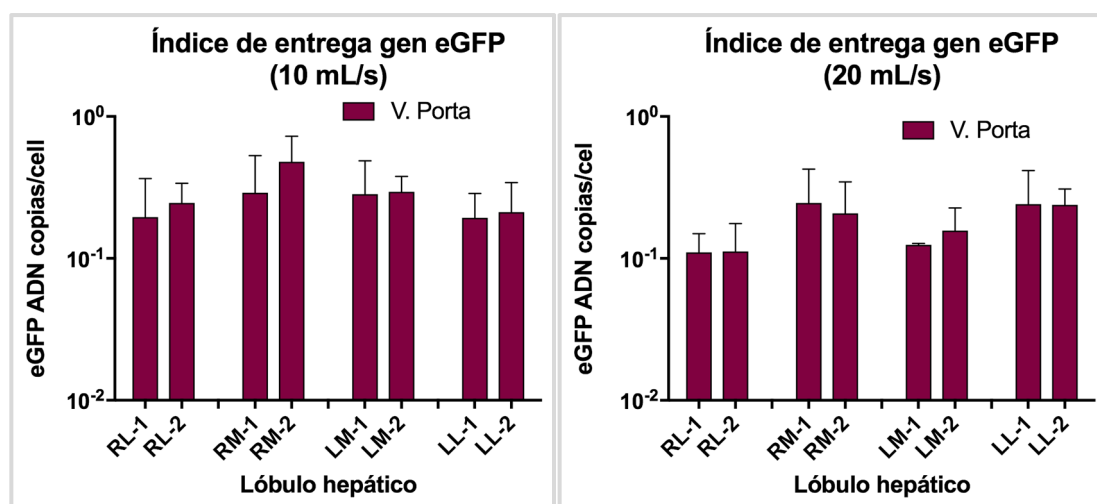


Figura 31.- En la gráfica de la izquierda se muestra las medias de los índices de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de perfusión de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml. En el gráfico de la derecha se muestra las medias del índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.

#### 6.5.5. Transcripción del gen al tejido hepático

En la figura 32 se muestra el índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático a distintas velocidades en el modelo quirúrgico 3. Los índices de transcripción se expresan como número de copias de ARN del gen eGFP por célula normalizada. Como se muestra en los gráficos, el índice de transcripción del gen eGFP es mayor cuando se perfunde a una velocidad de 20 ml/s. La transcripción también resulta homogénea en todas las muestras analizadas del tejido hepático.

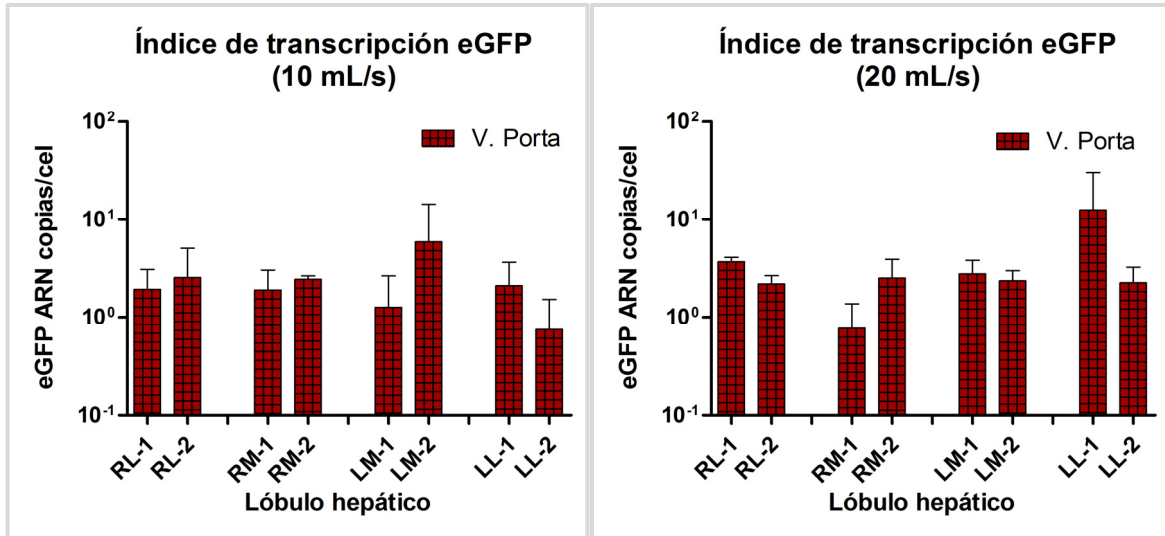


Figura 32.- En la gráfica de la izquierda se muestra las medias del índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml. En el grafica de la derecha se muestra las medias del índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por Vena Porta (MQ3) a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.

## 6.6. COMPARACIÓN ENTRE LOS MODELOS QUIRÚRGICOS 2 Y 3, A VELOCIDAD DE 10 ml/s

En la figura 33 se comparan los resultados de la entrega del gen eGFP al tejido hepático con un volumen de 200 ml y a una velocidad de 10 ml/s en el MQ 2 y el MQ 3. Los índices de entrega se expresan como copias de ADN del gen eGFP por célula. No se observan grandes diferencias entre ambos modelos quirúrgicos a esta velocidad.

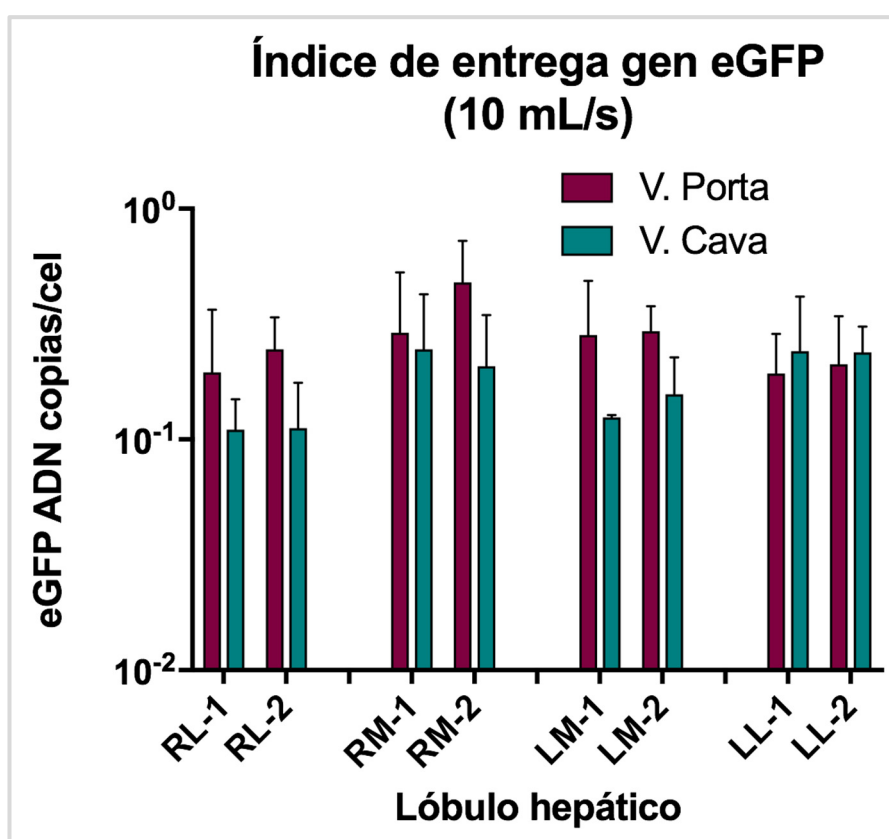


Figura 33.- Se muestran las medias de los índices de entrega del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml.

Al comparar la transcripción del gen eGFP en ambos modelos y a una velocidad de 10 ml/s el índice de transcripción del gen resulta superior en el modelo quirúrgico 2 (perfusión del gen por vena cava), es decir por vía retrógrada, a excepción de la muestra superior del lóbulo medial, aunque la diferencia no es significativa, tal y como se muestra en la figura 34.

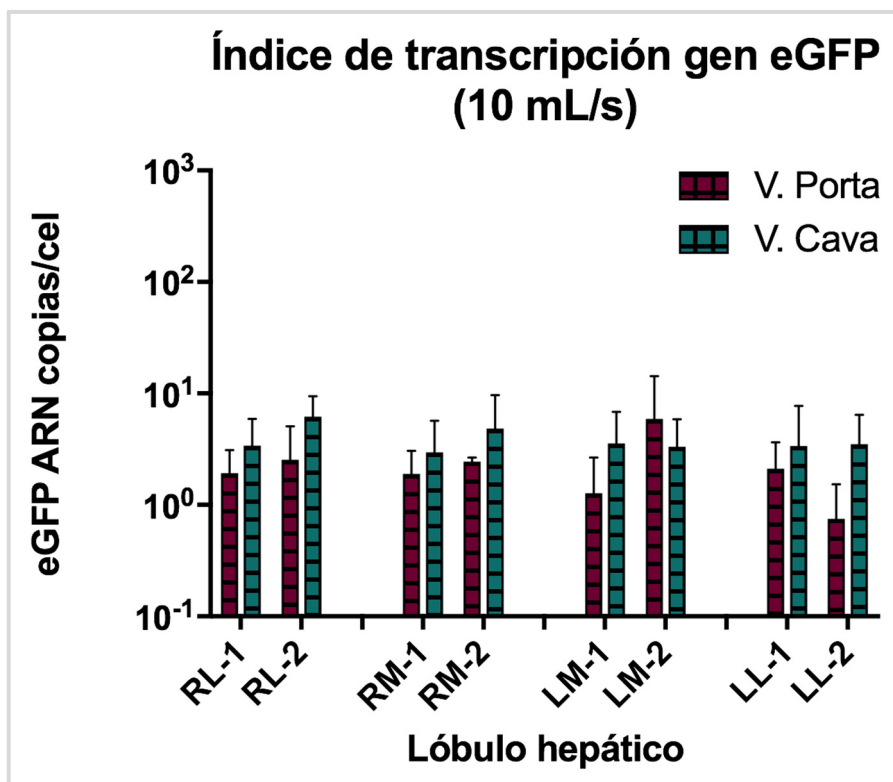


Figura 34.- Se muestran las medias de los índices de transcripción del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml.



## 6.7. COMPARACIÓN ENTRE LOS MODELOS QUIRÚRGICOS 2 Y 3 A VELOCIDAD DE 20 ml/s

En la figura 35 se muestra la comparación del índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático entre los MQ 2 y 3 a una velocidad de 20 ml/s.

A esta velocidad el índice de entrega aparente del gen resulta superior en todos los lóbulos en el modelo quirúrgico 3 (perfusión por vena porta), es decir por vía anterógrada, a excepción de la muestra inferior del lóbulo derecho del hígado del cerdo.

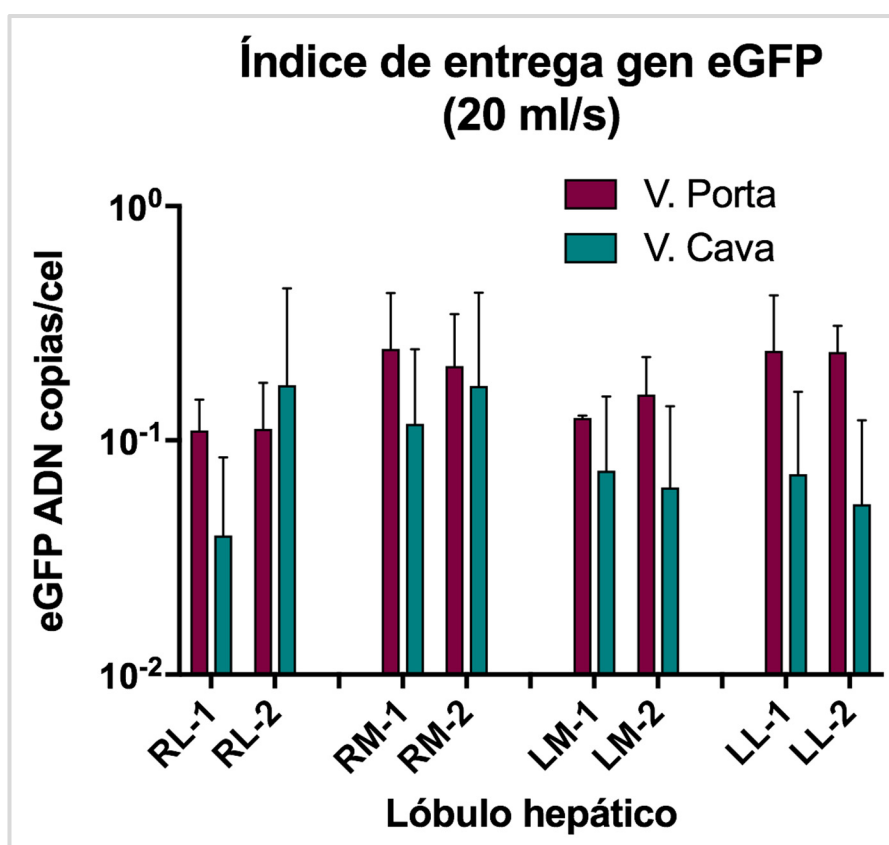


Figura 35.- Se muestra las medias de los índices de entrega del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.

En cuanto a la transcripción del gen existe una marcada diferencia en todas las muestras de tejido hepático entre ambos modelos quirúrgicos tal y como se muestra en la figura 36. La transcripción resulta superior en el modelo quirúrgico 2 (perfusión del gen por vena cava), es decir de forma retrógrada, observando que en algunas

muestras del tejido hepático llega a alcanzar un índice de transcripción 100 veces mayor que con el modelo quirúrgico 3.

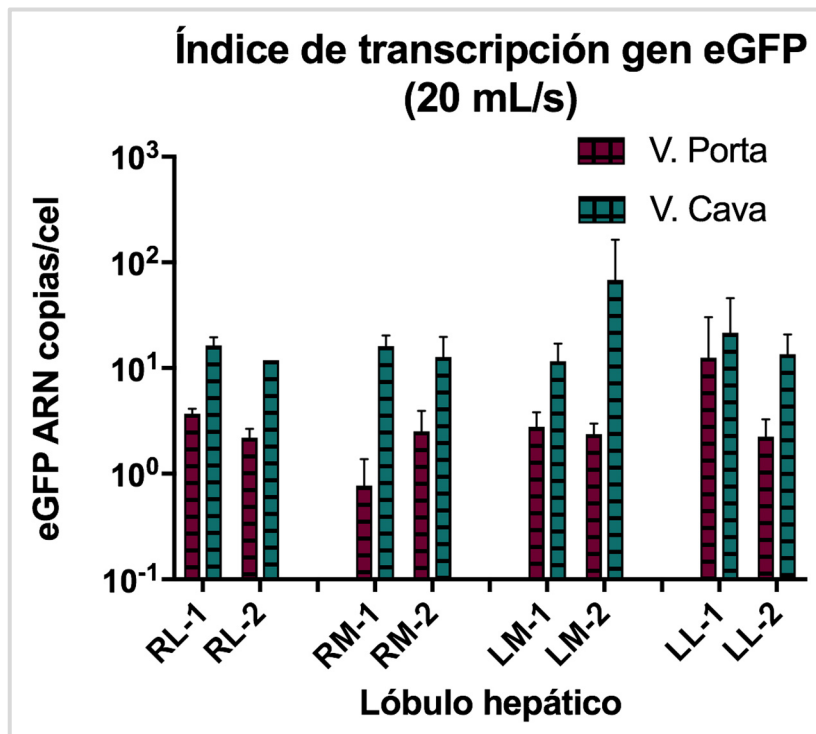


Figura 36.- Se muestra los índices de transcripción del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.

## 6.8. TRADUCCIÓN DE LA PROTEÍNA eGFP EN EL TEJIDO HEPÁTICO.

El siguiente paso del experimento consistió en unir los extractos proteicos de las muestras procedentes de las zonas superior e inferior de cada lóbulo hepático para evaluar la presencia de la proteína eGFP en el tejido.

La presencia de la proteína en el tejido hepático evalúa la traducción del gen. La detección semicuantitativa de la proteína se realizó mediante un test de western blot, sin embargo, dado que la sensibilidad de este procedimiento no es lo suficientemente elevada como para detectar valores bajos de proteína eGFP presente en el tejido, decidimos utilizar el Kit de ELISA especial de alta sensibilidad para la proteína eGFP con el fin de detectar el índice de traducción de la proteína de forma cuantitativa.

En la figura 37 se muestran los resultados medidos en moléculas de proteína eGFP por célula. No se observan diferencias significativas en la expresión de la proteína entre los modelos quirúrgicos 2 y 3 independientemente de las distintas condiciones utilizadas, a excepción de la muestra del lóbulo medial en el modelo quirúrgico 3 (vía anterógrada) a una velocidad de 10 ml/s, que resulta significativamente superior ( $p < 0,05$ ) con respecto al modelo quirúrgico 2 (vía retrógrada).

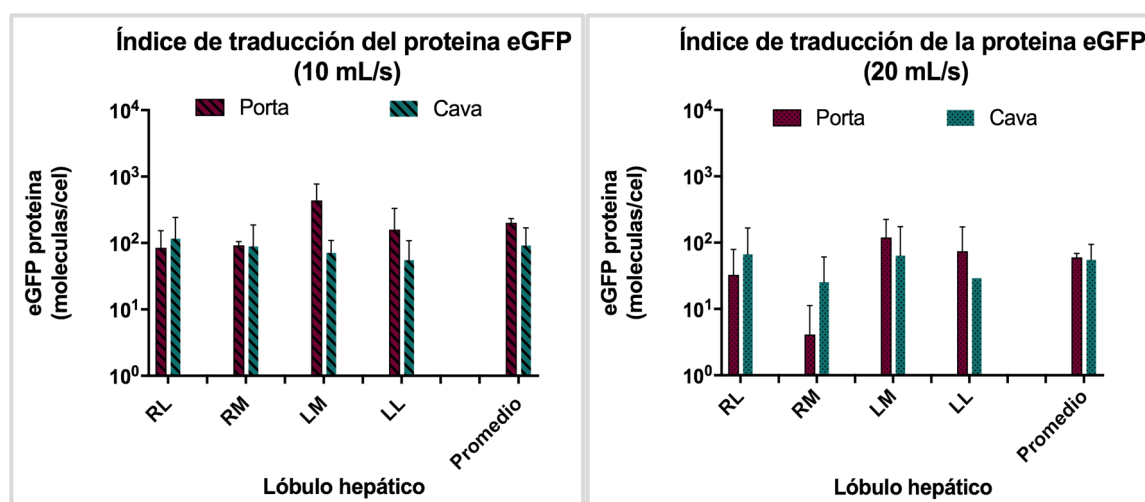


Figura 37.- Índice de traducción del gen eGFP. Se muestran las medias de los índices de traducción del gen y el promedio en el tejido hepático tras la transferencia génica en el MQ2 y MQ3 a distintas velocidades

---

## 6.9. TRANSFERENCIA DEL GEN hIL-10 CON INTERÉS TERAPÉUTICO

Una vez realizado el experimento de transferencia génica y determinado el modelo quirúrgico ideal para realizar una transferencia génica eficaz, procedimos a realizar este estudio con un gen de interés terapéutico.

Para ello utilizamos el gen que codifica la IL-10, que es una interleuquina capaz de modular la respuesta inflamatoria, de creciente interés en el ámbito del trasplante de órganos y en patologías de tipo inflamatorio.

El procedimiento para la entrega, transcripción y traducción del gen humano hIL-10 al tejido hepático es el mismo descrito en el modelo quirúrgico 2, en el cual la perfusión del gen se realiza por la vena cava (vía retrógrada). El volumen utilizado fue de 200 ml a una velocidad de 20 ml/s.

### 6.9.1. Índice de entrega del gen hIL-10 al tejido hepático

La entrega del gen fue medida y expresada en número de copias de ADN de hIL-10 por célula al décimo día post procedimiento. El índice de entrega del gen hIL-10 alcanzado tras 10 días post transfección se muestran en la figura 38.

Se observa una elevación de los valores de copias de ADN hIL-10 en el momento de la entrega del gen al tejido hepático en forma global en el grupo tratado, salvo en el lóbulo izquierdo medial en donde existe una mayor cantidad de copias de ADN hIL-10 por célula en el grupo control.

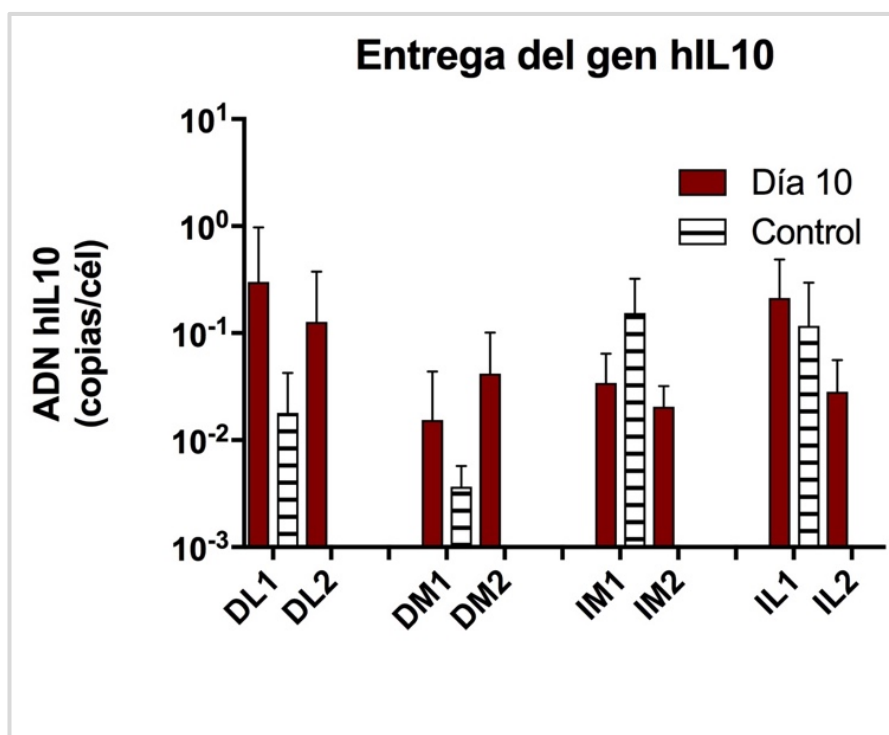


Figura 38.- Índice de entrega aparente del gen hIL-10. Se muestran los índices de entrega aparente del gen en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2 (perfusión por vena cava) a una velocidad de 20 ml/s y volumen de 200 ml comparados con las muestras control.

En el análisis estadístico de la entrega aparente del gen no se observó diferencia significativa entre los diferentes lóbulos. A continuación, en la tabla 13 se muestran los resultados del análisis conjunto del órgano completo no evidenciando diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control.

	Media (DE) (copias ADN/cel)	Mediana (RIC) (copias ADN/cel)	Valor p
Grupo Control	0,07 (0,12)	0,02 (0 – 0,05)	p =0,918 (control vs día 10)
Grupo Día 10	0,1 (0,27)	0,02 (0 – 0,006)	

Tabla 13.- Media y mediana del índice global de entrega aparente del gen hIL-10 en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2. RIC: rango intercuartílico.

### 6.9.2. Índice de transcripción del gen hIL-10 al tejido hepático

El índice de transcripción del gen hIL-10 al tejido hepático fue medido y expresado en número de copias de ARN de hIL-10 por célula normalizada. El índice de transcripción del gen hIL-10 alcanzado tras 10 días post transfección se muestra en la figura 39.

Se puede observar que los valores de ARN hIL-10 fueron evidentemente mayores en los animales en los que se realizó el procedimiento que en los controles. El resultado es bastante homogéneo en todos los lóbulos.

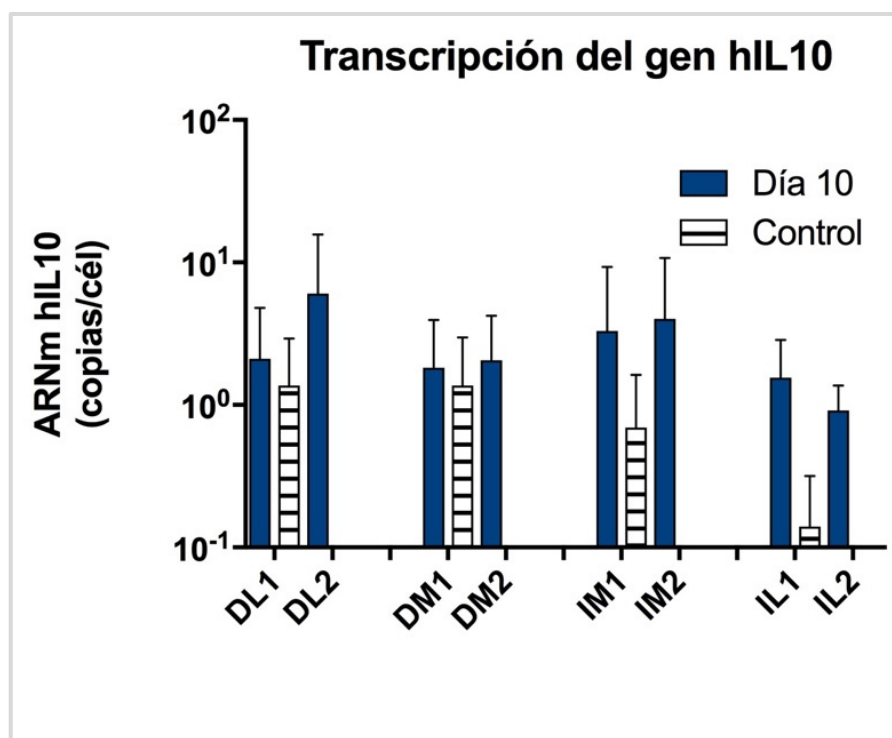


Figura 39.- Índice de transcripción del gen hIL-10. Se muestran los índices de transcripción del gen en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2 (perfusión por vena cava) a una velocidad de 20 ml/s y volumen de 200 ml comparado con las muestras control.

En el análisis estadístico de la transcripción del gen hIL-10 no se observó diferencia significativa entre los diferentes lóbulos. A continuación, en la tabla 14 se muestran los resultados del análisis conjunto del órgano completo sin existir una diferencia significativa con respecto a los animales control.

	Media (DE) (copias ARN/cel)	Mediana (RIC) (copias ARN/cel)	Valor p
Grupo Control	0,89 (1,14)	0,26 (0,08 – 1,18)	p =0,581 (control vs día 10)
Grupo Día 10	2,73 (4,72)	0,94 (0,59 – 1,95)	

Tabla 14.- Media y mediana del índice global de transcripción del gen hIL-10 en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2. \* RIC: rango intercuartílico.

### 6.9.3 Índice de traducción de la proteína hIL-10

Para determinar el índice de traducción de la proteína hIL-10 en el tejido hepático, realizamos un test de ELISA específico para la cuantificación de dicha proteína. Los resultados se muestran en la figura 40. El índice de traducción de la proteína hIL-10 se expresa en número de copias de proteína hIL-10 por célula normalizada.

Podemos observar que la traducción de la proteína es significativamente mayor en los cerdos utilizados en el procedimiento con respecto a sus controles.

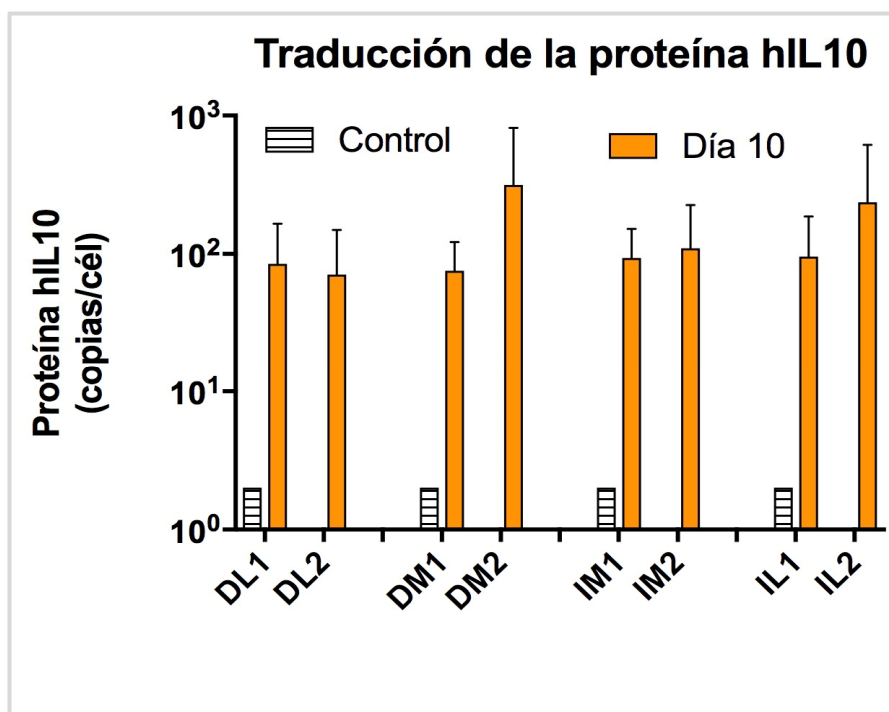


Figura 40.- Índice de traducción a aparente del gen hIL-10. Se muestran los índices de traducción del gen en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2 (perfusión por vena cava) a una velocidad de 20 ml/s y volumen de 200ml.

En el análisis estadístico de la traducción del gen hIL-10 se observó diferencia significativa entre los diferentes lóbulos, ya que no se detectó proteína en el tejido hepático. A continuación, en la tabla 15 se muestran los resultados del análisis conjunto del órgano completo existiendo diferencia significativa con una  $p < 0,001$ .

	Media (DE) (copias proteína hIL-10 /cel)	Mediana (RIC) (copias proteína hIL-10 /cel)	Valor p
Grupo Control	0 (0)	0 (0)	p <0,001 (control vs día 10)
Grupo Día 10	135,32 (227,33)	86 (29,75 – 122,5)	

Tabla 15.- Media y mediana del índice global de traducción del gen hIL-10 en el tejido hepático tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2. \*RIC: rango intercuartílico.

#### 6.9.4. Medición de la proteína hIL-10 en plasma.

Los resultados de la medición de la proteína IL-10 en sangre mostraron una elevación progresiva hasta alcanzar su máximo pico en el día dos después del procedimiento, disminuyendo progresivamente hasta presentar una segunda elevación en el día 7 tal y como se muestra en la figura 41.

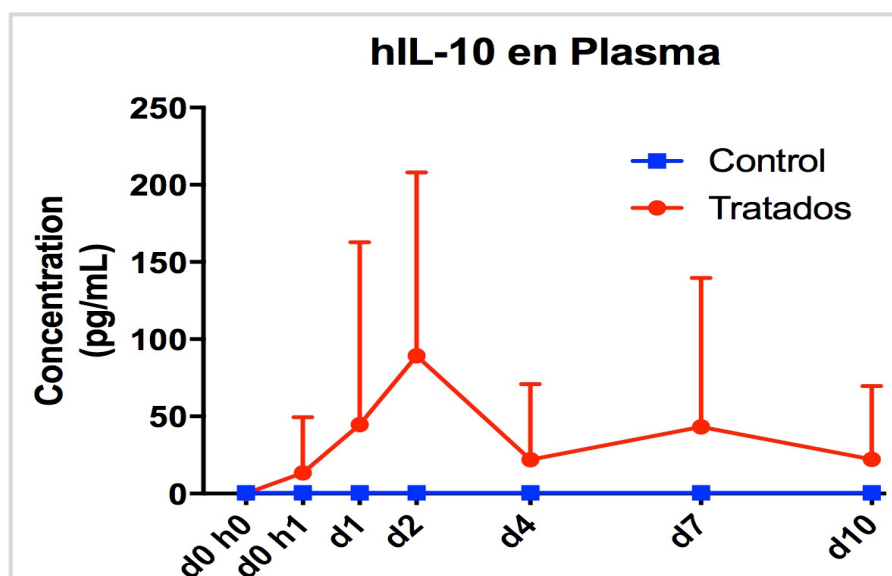


Figura 41.- Niveles de hIL-10 en plasma en el grupo control y el grupo tratado. Se muestran las concentraciones plasmáticas promedio de la proteína (pg/ml) a diferentes tiempos (horas, días) tras la transferencia génica en el modelo quirúrgico 2 (perfusión por vena cava) con una velocidad de 20 ml/s y un volumen de 200 ml.



# Discusión

---



## 7. DISCUSIÓN

La terapia génica exitosa necesita de un gen terapéutico relevante, un vector adecuado que suministre eficazmente el gen a las células diana, y por último un órgano con las condiciones adecuadas para que este gen pueda ejercer su función dentro de la célula. Estos dos últimos requisitos han sido el objeto de múltiples estudios encaminados a descubrir el vector más efectivo para realizar la transferencia génica y el órgano que ofrezca las mejores condiciones para la realización de dicho procedimiento.

La primera incertidumbre surgida fue el órgano a utilizar para realizar la transferencia génica. Diferentes órganos y tejidos han sido empleados para la terapia génica. En el año 2003 Lu et al realizaron la transferencia génica en las células del músculo esquelético, eligiendo este tejido por sus propiedades fisiológicas, fácil accesibilidad, gran aporte vascular y por su gran capacidad regenerativa <sup>(118)</sup>. En 1992, Chapmann et al<sup>(119)</sup> realizaron la transferencia génica en las arterias coronarias mediante cateterismo eligiendo el tejido cardíaco debido a su rica vascularización y al tamaño del órgano. Otros autores han utilizado el pulmón, el riñón, el cerebro, etc.

Es evidente que no hay un consenso sobre qué órgano utilizar para la transferencia génica, pero en lo que hay acuerdo es que lo más importante es crear las condiciones adecuadas para que el procedimiento de transferencia génica pueda realizarse eficazmente.

En nuestro trabajo utilizamos el hígado como órgano ideal ya que es el encargado de la mayor producción de moléculas en el organismo y precisamente esta característica convierte a dicho órgano en un blanco ideal para la terapia génica <sup>(47,120)</sup>, ya que contiene los mecanismos necesarios para la producción de moléculas fisiológicas y la distribución a través del torrente sanguíneo. El siguiente paso necesario fue desarrollar una estrategia sistemática para asegurar la entrega eficiente

---

de los genes, con miras a su posterior transferencia al entorno de la práctica clínica rutinaria.

Las moléculas de ADN desnudas no entran eficientemente en las células debido a su gran tamaño y naturaleza hidrofílica y a los grupos de fosfato cargados negativamente situados en la membrana celular. Además, son muy susceptibles a la degradación mediada por las nucleasas. Por lo tanto, el reto principal para la terapia génica es desarrollar portadores y métodos físicos que faciliten la transferencia de gen a células diana sin degradación del gen suministrado.

Por ello otro factor importante a considerar en nuestro estudio fue el tipo de vector utilizado para incorporar el gen en el interior de la célula. Nosotros empleamos la inyección hidrodinámica como método físico-químico para la introducción del gen al interior de la célula, a diferencia de los otros métodos utilizados, este método es considerado el más eficiente dentro de los métodos físico-químicos para la transferencia génica *in vivo*. Usando este método es posible obtener niveles de expresión génica en ratones y en animales más grandes tal y como hemos demostrado<sup>(37,121,122)</sup>.

Desafortunadamente el enfoque de entrega hidrodinámica no es fácilmente aceptable para los animales más grandes dado que no sobrevivirían a las grandes inyecciones de volumen requerido para distender el hígado. En consecuencia, se han desarrollado varias estrategias para extender dicha terapia al uso humano.

La transferencia de genes hepáticos no virales se llevó a cabo en ratones. La administración de genes se logró mediante la inyección de grandes volúmenes de solución salina (en relación con el volumen sanguíneo circulante del ratón), que contiene un gen trazador a través de la vena caudal del ratón a una velocidad de flujo rápido (inyección hidrodinámica). Esta inyección fue anterógrada. Los ratones produjeron la proteína codificada por el gen inyectado durante 150 días, y se observó que la expresión génica disminuyó a lo largo de este período, pero resultó en una exitosa transfección hepática por acceso retrógrado al hígado, debido a que el elevado

volumen administrado provocó una inversión transitoria de la presión venosa portocava.<sup>(123)</sup> La expresión subterapéutica a largo plazo (6 meses) de la proteína  $\alpha$ 1-antitripsina humana se consiguió por Zhang et al.<sup>(124)</sup> Posteriormente, Aliño et al también obtuvieron la expresión de esta proteína a concentraciones terapéuticas durante 6 meses <sup>(125)</sup>. En otro estudio, Crespo et al <sup>(126)</sup> utilizaron la microscopía intravital para demostrar que la inversión del flujo sanguíneo se produce después de la inyección, con la formación de vesículas endocíticas. Estos resultados indicaron que la presión ejercida por inyección y retorno venoso provocan el aumento de la presión intrahepática, lo que favorece la penetración de la solución génica de los hepatocitos a través de la membrana celular.

Una vez demostrado, en estudios, que se puede expresar el gen en animales de laboratorio pequeños, trasladamos el modelo a un animal más grande como el cerdo que, aunque con un peso comparativamente menor, es similar anatómicamente al humano. Khorsandi et al. <sup>(127)</sup> realizaron la inyección del gen en el hígado mediada por catéter con balón, para evitar el reflujo de la solución, pero sin generar la presión adecuada dentro del órgano. El suministro de genes no fue lo suficientemente alto para ejercer una función terapéutica, indicando así que se requería generar un aumento de la presión del órgano, para evitar pérdidas y poder romper la barrera de la membrana celular. Estos resultados fueron confirmados por estudios posteriores <sup>(128-130)</sup> en los que se bloqueó el flujo de salida de la vena porta a fin de evitar pérdidas.

En la literatura, sólo los segmentos individuales de hígado han sido sometidos a bloqueo de vascularización, y la expresión génica se circunscribió al segmento inyectado. Pensamos que sería interesante lograr una transferencia de genes eficiente a todo el hígado y no únicamente a determinados lóbulos, con el fin de producir niveles sistémicos de la proteína. Se planteó la necesidad de una estrategia en la que el hígado entero estuviera hermético, para que la inyección de la solución génica aumentara la presión intrahepática y los genes alcanzaran eficazmente los núcleos de los hepatocitos.

---

El estudio del proceso de transferencia génica se ha llevado a cabo a partir de la cuantificación del ADN entregado, el ARN transcrito, la proteína traducida y la proteína medida en sangre y ha sido expresado utilizando parámetros fácilmente comprensibles como es el número de copias de estas especies moleculares por célula y en miligramos por mililitro en el caso de la proteína en sangre. Cuantificar estos datos nos hizo poder comparar la expresión del gen en el tejido hepático tras la transferencia génica. Estudios previos han documentado que la expresión de proteínas en sangre tras la transferencia génica de los genes que la codifican era deficiente en animales de mayor tamaño sin causa aparente <sup>(131)</sup>.

La transferencia génica hidrodinámica ya ha demostrado, en el modelo murino, que es un método eficiente para el proceso de la transferencia del gen al interior de la célula y la expresión del gen mediante la presencia de la proteína codificada en sangre. En el año 2003, Aliño et al consiguió la expresión plasmática de la proteína humana de la alfa-1-antitripsina en niveles terapéuticos durante más de 6 meses en ratones, tras la transferencia hidrodinámica del gen hAAT <sup>(125)</sup>, en este caso la entrega del gen se comprobó por la inversión del flujo sanguíneo intrahepático tras la perfusión de la solución salina compuesta por el gen, esta solución era capaz de penetrar la barrera vascular y entrar dentro del hepatocito.

Tras haberse confirmado que la hidrofeción era capaz de mediar la expresión en niveles terapéuticos de una proteína, el siguiente paso fue trasladar la técnica a modelos animales de mayor tamaño y con mayor similitud, tanto anatómica como fisiológica, al ser humano. El modelo utilizado por Aliño et al en el año 2003 es inviable en animales de mayor tamaño ya que se debería doblar la volemia del animal en escasos segundos y es por ello que se debían modificar los parámetros de la perfusión para que el procedimiento fuera factible. La manera de conseguir un aumento de la presión intrahepática sin causar deterioros hemodinámicos sistémicos consistía en la perfusión aislada sobre el órgano, de modo que a su vez se podría disminuir el volumen de solución requerido <sup>(129-132)</sup>.

Para alcanzar una presión elevada dentro del hígado, además de utilizar volúmenes de solución génica y velocidades de flujo más exigentes, se plantearon diferentes estrategias con las que realizar una perfusión más selectiva del órgano, limitando parcialmente la vascularización del hígado <sup>(121,128,131)</sup>. A pesar de todos los intentos realizados por diferentes grupos en todo el mundo, modificando las condiciones de velocidad y presiones, en ningún caso se han alcanzado niveles plasmáticos de una proteína que se acerque a valores de los niveles terapéuticos requeridos tras realizar una hidrofección hepática en animales de mayor tamaño.

Dado que no se consiguió averiguar la causa por la cual un procedimiento tan eficaz en el modelo murino resultaba tan ineficiente en un animal de mayor tamaño, se decidió plantear la evaluación del procedimiento mediante un estudio molecular detallado del proceso de decodificación génica, realizando determinaciones cuantitativas de la expresión del gen, que no se habían realizado con anterioridad. Este planteamiento nos llevaba a conseguir datos exactos de número de copias de gen entregado, transcrito, traducido y la proteína en sangre. Para todo esto debíamos establecer las condiciones óptimas de PCR y ELISA para alcanzar la linealidad y que los datos interpolados fueran fiables. Después de transformar los datos en parámetros fácilmente comprensibles y cuantificables obtuvimos los índices de entrega, transcripción y traducción por célula, medidos en ADN y ARN y proteína total por célula normalizada.

Los modelos propuestos con anterioridad <sup>(18,37,121,132)</sup> sugerían que el cierre vascular hepático potenciaba la eficiencia del procedimiento, pero en ningún caso dicho cierre se había realizado por completo resultando totalmente estanco. En el presente trabajo desarrollamos un procedimiento quirúrgico en el que la transferencia génica se lleva a cabo *in vivo* con el órgano vascularmente excluido.

Hemos realizado mediante una laparotomía en el animal, la exclusión vascular hepática para mantener un órgano aislado y hermético, para evitar perfundir grandes cantidades de solución y ejercer con menos volumen similares presiones dentro del hígado y así favorecer la transferencia génica. La técnica quirúrgica que mostramos

---

en el estudio hace que el hígado esté vascularmente estanco durante un breve intervalo de tiempo (< 10 min) a través de la interrupción de la vascularización del órgano *in vivo*. Este procedimiento no supone un riesgo para los animales, como hemos demostrado tal y como se muestran en las tablas 7,9 y 11, y como lo señalan otros autores <sup>(133,134)</sup> que estudiaron isquemia hepática durante períodos de tiempo más prolongados. La técnica es invasiva (laparotomía) pero también fácil y rápida (< 1 h), y resulta inocua para los cerdos. Así, se evaluaron la eficiencia y los efectos adversos de la transferencia génica sobre el animal bajo diferentes condiciones de volumen de solución génica (200, 400 y 600 ml), velocidad de perfusión (10, 20, y 60 ml/s) y sentido de la inyección (anterógrada y/o retrógrada).

En el modelo quirúrgico 1 comprobamos la viabilidad del procedimiento, utilizamos las dos vías simultaneas (anterógrada y retrógrada), mayores volúmenes y velocidades. Con un volumen de 400 ml y a una velocidad de 20 ml/s la entrega aparente del eGFP obtuvo un rango de 0,5 – 2,46 eGFP ADN copias/célula normalizada y la transcripción del gen un rango de 2,108 – 4,915 eGFP ARN copias/célula normalizada. Con un volumen de 600 ml y a una velocidad de 60 ml/s la entrega aparente del gen alcanzó un rango de 0,016 – 0,068 eGFP ADN/célula normalizada y la transcripción del gen un rango de 1,485 – 15,293 eGFP/célula normalizada. En cuanto a la eficiencia de la transferencia génica y los efectos adversos, no se mostraron diferencias al realizar el procedimiento con distintas velocidades de perfusión y distintos volúmenes.

En el modelo quirúrgico 2 utilizamos la vía retrógrada a 10 y 20 ml/s de velocidad de perfusión y con 200 ml de volumen. A una velocidad de 10 ml/s la entrega aparente del gen alcanzó un rango de 0,038 – 0,441 eGFP ADN/célula normalizada en cuanto a la transcripción del gen un rango de 0,144 – 9,720 eGFP ARN/célula normalizada. En cambio, a una velocidad de 20 ml/s la entrega aparente del gen alcanzó un rango de 0,002 – 0,488 eGFP ADN/célula normalizada y en cuanto a la transcripción alcanzó un rango de 6,514 – 178,178 eGFP ARN/célula normalizada. Observamos una mayor entrega aparente de genes en el tejido hepático



con una velocidad de perfusión de 10 ml/s. Es mayor y más significativa la diferencia en el momento de medir la transcripción, evidenciando una elevación de casi 100 veces los valores de copias ARN del gen eGFP/células a una velocidad de perfusión de 20ml/s.

En el modelo quirúrgico 3 utilizamos la vía anterógrada a 10 y 20 ml/s de velocidad de perfusión y con 200 ml de volumen. A una velocidad de 10 ml/s la entrega aparente del gen alcanzó un rango de 0,018 – 0,524 eGFP ADN/célula normalizada y la transcripción del gen, un rango de 0,224 – 15,578 eGFP ARN/célula normalizada. En cambio, con una velocidad de 20 ml/s la entrega aparente del gen obtuvo un rango de 0,038 – 0,435 eGFP ADN/célula normalizada y la transcripción del gen alcanzó un rango de 0,350 – 33,074 eGFP ARN/célula normalizada. Mostramos que la entrega aparente del gen es mayor con una velocidad de perfusión de 10 ml/s. El índice de transcripción es mayor cuando se realiza a una velocidad de perfusión de 20 ml/s.

En cuanto a la comparación de los modelos quirúrgicos 2 y 3 y sus distintas velocidades de perfusión. Observamos que la entrega aparente del gen fue mayor en el modelo quirúrgico 3 (vía anterógrada) y la transcripción fue mayor en el modelo quirúrgico 2 (vía retrógrada).

En cuanto al estado hemodinámico del animal durante el procedimiento quirúrgico, la presión arterial cae cuando la circulación está bloqueada, pero esto es seguido por una recuperación rápida (en 3 min) cuando el hígado es revascularizado. Sawyer et al. <sup>(135)</sup> describieron la prolongación del segmento QRS después de inyectar 1-8% del volumen de peso a 100 ml/s en ratas. Además de monitorizar a los animales durante el procedimiento quirúrgico, se midieron los valores de enzimas hepáticas en sangre para observar el daño hepático generado, evidenciando una leve elevación transitoria de la enzima GOT, la cual se normalizó tras 24 horas del procedimiento, salvo en el modelo quirúrgico 1 donde permaneció elevada e inclusive triplicó su valor. La enzima GPT no mostró ninguna alteración en los procedimientos. Fabre et

---

al.<sup>(121)</sup>, demostraron en ratones una leve elevación de las transaminasas después del procedimiento, sin repercusión clínica, al igual que en el presente estudio.

Los trabajos realizados por otros grupos sugerían que para mejorar la eficiencia del procedimiento se requerían unas condiciones de perfusión extremas, en cuanto al volumen y velocidad de inyección, para vencer la elasticidad del hígado y así ejercer la suficiente presión para facilitar la entrada del gen a los hepatocitos<sup>(129,130)</sup>. A pesar de estos resultados, nuestros experimentos con volúmenes de 400 y 600 ml y a velocidades de 40 y 60 ml/s e inyección simultánea por vena cava y porta (modelo quirúrgico 1) mostraron no solo que la eficiencia de la transferencia génica no mejoraba bajo estas condiciones, sino que, por el contrario, empeoraba. A todo esto, se le suma que la elevación de las transaminasas en sangre periférica, resultó mucho peor que la elevación con condiciones de 10 y 20 ml/s de velocidad de perfusión y con 200 ml de volumen. En nuestro trabajo, el procedimiento de transferencia génica empleando condiciones más suaves (a una velocidad de 10 y 20 ml/s y con un volumen de perfusión de 200 ml) resultó seguro y no se observaron daños en el tejido como el reportado por Suda et al en el modelo murino en el 2007<sup>(37)</sup>.

Con estos hallazgos decidimos utilizar las condiciones de hidrofusión más suaves (a una velocidad de 10 y 20 ml/s y con un volumen de perfusión menor, de 200 ml). Así establecimos el volumen fijo a 200 ml de solución génica y valoramos el efecto de la velocidad de perfusión y el sentido de la inyección (anterógrado o retrógrado). Con estas condiciones el animal no sufrió cambios hemodinámicos durante el procedimiento al igual que con el modelo quirúrgico 1. Cuando se realizó el procedimiento bajo condiciones más suaves existió una elevación transitoria de las transaminasas en sangre periférica, pero volviendo a valores normales rápidamente. Se evaluaron las distintas fases del proceso de decodificación genética del gen transferido mediante PCR cuantitativa y ELISA.

Comparando el modelo quirúrgico 2 y el modelo quirúrgico 3, en cuanto al índice de entrega del gen de eGFP a una velocidad de 10 ml/s los resultados son similares. En cambio, a una velocidad de 20 ml/s la entrega aparente del gen resulta

superior en el modelo quirúrgico 3 (vía anterógrada). En el mejor de los casos, se consiguió entregar cerca de una copia del gen por célula normalizada. La distribución de la entrega génica es difícil de determinar y podría también ser interpretada como la entrega en varios cientos de copias del gen en un reducido número de células.

Al analizar la transcripción del ARN en el tejido hepático, se observó lo contrario a lo visualizado con la entrega, es decir la vía más eficiente para la transcripción fue la vía retrograda (modelo quirúrgico 2). Por vía retrograda a 20 ml/s se obtiene mayor índice de transcripción del gen mientras que por vía anterógrada (modelo quirúrgico 3) los índices alcanzados son menores y parecidos entre las distintas velocidades empleadas. Esto sugiere que el gen entregado por vía retrograda presenta una mayor biodisponibilidad para ser transcrito.

La expresión de la proteína en el tejido se intentó evaluar mediante microscopia de fluorescencia, pero, desafortunadamente, no fue posible encontrar ninguna señal de la proteína. Se probó entonces, a determinar la proteína por Western Blot obteniendo el mismo resultado negativo. Por ello utilizamos un kit de ELISA de alta sensibilidad que permite determinar niveles de proteína eGFP pg/ml. Con esta prueba sí pudimos cuantificar el número de copias de proteína por célula normalizada en el tejido hepático. El índice de traducción fue ligeramente superior con la perfusión del gen a 10 ml/s y por vía anterógrada (modelo quirúrgico 3). Alcanzó un máximo de 100 moléculas de eGFP por célula. Este es un valor muy bajo de producción proteica lo cual sugiere que, de algún modo, una situación de estrés celular mediado por el procedimiento de hidrofeción en el tejido hepático del cerdo puede estar bloqueando la expresión del gen durante un tiempo, como ya ha sido sugerido en diferentes trabajos <sup>(136,137)</sup>.

Según estos resultados, se decidió emplear el modelo quirúrgico que más eficacia demostró, en cuanto a la transcripción del gen, empleando un gen terapéutico con el fin de evaluar el potencial interés terapéutico del procedimiento y su aplicación a la práctica clínica. Además, pretendimos aclarar, si el bloqueo en la traducción de un gen exógeno se supera con el paso del tiempo, analizando muestras periódicas de

---

sangre y las muestras de tejido al décimo día de la realización del procedimiento. Es así como el modelo quirúrgico 2 es el modelo empleado para la utilización del gen hIL-10 con interés terapéutico calculando también el índice de entrega, transcripción, traducción y medición de la proteína en sangre.

En cuanto a la utilización del gen hIL-10, al medir la entrega del gen al tejido hepático se observó que la expresión del gen fue prácticamente similar al alcanzado con el gen eGFP, pero hay que tener en consideración que la determinación con el gen hIL-10 se realiza 10 días tras el procedimiento quirúrgico con lo que el proceso de hidrólisis ha podido ser completado y por tanto eliminado cualquier ADN localizado en el espacio intersticial. También en este lapso de tiempo las enzimas del organismo pueden actuar eliminando cualquier secuencia genética heteróloga que no haya sido incorporada dentro de la célula.

Cuando medimos el índice de transcripción del gen IL-10 al tejido hepático quedó 10 veces por debajo del obtenido con el gen eGFP y esto creemos que puede ser debido al tiempo transcurrido entre la realización del procedimiento y el análisis del tejido hepático o bien al promotor utilizado con el gen.

Se cuantificó la presencia de la proteína humana IL-10 en sangre periférica en muestras obtenidas periódicamente desde la intervención quirúrgica de los animales hasta su sacrificio. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína se traducía eficientemente con respecto a los controles. Así se observó un incremento de su presencia progresivo hasta el día 2 en donde se observa un pico máximo (89,3 pg/ml) que descendió en el día 4, y volvió a presentar una ligera elevación en el día 7, disminuyendo luego hasta 22 pg/ml. En el momento de máxima expresión (día 2) los niveles de proteína quedaron 15 veces por encima de los valores normales de IL-10 en pacientes sanos.

Una de las limitaciones principales del estudio es que, a pesar de que el cerdo es un animal anatómicamente semejante al humano, se ha empleado un gen propio del humano. Esto es, en realidad, una limitación de todos los experimentos realizados

con animales en los cuales se intenta estudiar patologías propias del hombre. En cuanto a la técnica quirúrgica destaca la agresividad de la misma y que en sí la exclusión vascular total conlleva riesgos. Otro punto en contra observado en el experimento fue la baja expresión del gen hIL-10 en sangre que no pudo ser detectado con la técnica de Western Blot, necesitando emplear para ello la técnica ELISA ultrasensible.

Con respecto al experimento realizado consideramos que uno de los puntos fuertes es la utilización de un modelo animal anatómicamente muy semejante al humano. Esto hace que la técnica quirúrgica realizada sea aplicable al humano siguiendo las mismas pautas descritas. Además, es el primer estudio que emplea un modelo animal de gran tamaño para realizar la transferencia génica con esta técnica. Otro de los puntos a destacar es que el procedimiento no ha resultado tóxico, ni especialmente dañino para el animal en el estudio realizado, siguiendo todas las normas internacionales para el uso de animales de experimentación.

En cuanto a la aplicabilidad clínica del experimento, sabemos que la IL-10 es una interleuquina con la capacidad natural de modular la respuesta inmune disminuyendo la expresión de citosinas proinflamatorias. En el campo del trasplante de órganos, la IL-10 administrada sistémicamente ha demostrado efectos positivos en cuanto a la tolerancia del injerto <sup>(138)</sup>, aunque la administración sistémica de esta interleuquina tiene efectos pleiotrópicos indeseables, por ello la administración local en nuestro experimento ofrece la ventaja de evitar esos efectos indeseables. En este trabajo se demuestra por primera vez que el procedimiento hidrodinámico entrega, transcribe y traduce eficientemente el gen IL10 al tejido hepático del cerdo mediante una técnica de exclusión vascular total, logrando índices de expresión de proteína tisular que podrían mediar efectos farmacológicos con interés para controlar la respuesta inmune después del trasplante hepático. Además, el modelo descrito permite estudiar la eficacia de cualquier gen con interés clínico y prevé su eficacia en humanos *in vivo* como paso previo y necesario al inicio clínico de la terapia génica hidrodinámica en humanos.

---

Este experimento abre las puertas a investigaciones futuras para trasladar el modelo quirúrgico al humano, ya sea con segmentos hepáticos, hígados enteros, hígados en perfusión continua, etc. que servirán para la búsqueda de la mejor terapia aplicada a la clínica.

# Conclusiones

---





## 8. CONCLUSIONES

- 1.- Hemos descrito la técnica quirúrgica de transferencia génica mediante la exclusión vascular hepática total en un modelo porcino
- 2.- El modelo quirúrgico es reproducible en otros estudios utilizando las mismas condiciones descritas. Los objetivos previstos en cada etapa del estudio se han cumplido con una mortalidad de 7%, lo cual demuestra la viabilidad del procedimiento.
- 3.- En una exclusión vascular hepática estanca se obtiene la máxima eficacia realizando una perfusión retrógrada por cava con un volumen de 200 ml a una velocidad de 20 ml/s, obteniendo en la entrega aparente del gen un rango de 0,002 – 0,488 eGFP ADN/célula normalizada y en la transcripción del gen un rango de 6,514 – 178,178 eGFP ARN/célula normalizada.
- 4.- En las condiciones optimizadas, anteriormente mencionadas, la transferencia del gen hIL10 ha permitido alcanzar diferencias significativas en la expresión de la proteína, reforzando el potencial valor traslacional del procedimiento.



# Bibliografía

---



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lederberg Joshua MCA. “Ome sweet” omics a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001;15(8).
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
3. Pardo A. [The human genome and advances in medicine: limits and future prospects]. *Arch Bronconeumol*. 2004 Mar;40(3):133–8.
4. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar 12;14(4):295–300.
5. Lyngstadaas A. Status and potential of gene therapy in clinical medicine. Assessment of an emerging health technology through systematic survey of clinical gene therapy protocols and published results. *Int J Technol Assess Health Care*. 2002;18(3):645–74.
6. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet*. 2011 May 6;12(5):316–28.
7. Matthews QL, Curiel DT. Gene therapy: human germline genetic modifications--assessing the scientific, socioethical, and religious issues. *South Med J*. 2007 Jan;100(1):98–100.
8. Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, Levron J, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod*. 1998 Mar;4(3):269–80.
9. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):299–304.
10. Valenzuela CY. Ética científica de la terapia génica de individuos: Urgencia de la Cirugía Génica del ADN. *Rev Med Chil*. 2003 Oct;131(10):1208–14.
11. Bank A. Human somatic cell gene therapy. *BioEssays*. 1996 Dec;18(12):999–1007.

- 
12. NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules (NIH Guidelines) - April 2016 [Internet]. Available from: [http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH\\_Guidelines.html](http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html)
  13. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972 Mar 3;175(4025):949–55.
  14. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 2001 Jan;7(1):33–40.
  15. Novelli G. Genome Medicine: Gene Therapy for the Millennium. *Pharmacogenomics*. 2002 Jan;3(1):15–8.
  16. Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene Transfer Technology in Therapy: Current Applications and Future Goals.
  17. Kresina TF. An introduction to molecular medicine and gene therapy. Wiley-Liss; 2001. 386 p.
  18. Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, et al. DNA delivery to “ex vivo” human liver segments. *Gene Ther*. 2012 May;19(5):504–12.
  19. Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India*. 2013 Feb;61(2):127–33.
  20. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014 Jul 15;15(8):541–55.
  21. Davis ME. Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol*. 2002 Apr;13(2):128–31.
  22. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J*. 2009 Dec 16;11(4):671–81.
  23. Gao X, Kim K-S, Liu D. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J*. 2007 Mar;9(1):E92–104.
  24. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceut Med*. 2011 Oct 1;25(5):293–306.

25. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465–8.
26. Habib NA, Ding SF, el-Masry R, Mitry RR, Honda K, Michail NE, et al. Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev*. 1996;20(2):103–7.
27. Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(24):9568–72.
28. Kuriyama S, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Tsujimoto T, et al. Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther*. 2000 Jul 6;7(13):1132–6.
29. Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther*. 2010 Aug;10(4):312–7.
30. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982;1(7):841–5.
31. Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, Moradpour D, Gilbert R, Wands J, et al. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett*. 1996;389(225).
32. Suzuki T, Shin B-C, Fujikura K, Matsuzaki T, Takata K. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett*. 1998;425(3):436–40.
33. Liu F, Huang L. Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. 2002 Jul 25;9(16):1116–9.
34. Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther*. 2006 Nov 30;
35. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther*. 2004 Apr 15;11(8):675–82.

- 
36. Andrianaivo F, Lecocq M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot M. Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. *J Gene Med*. 2004 Aug;6(8):877–83.
  37. Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther*. 2006 Sep 21;14(2):129.
  38. Navarro J, Risco R, Toschi M, Schattman G. Gene Therapy and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). A Review. *Placenta*. 2008 Oct;29:193–9.
  39. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(1):46–60.
  40. Kim T, Rothmund T, Kissel T, Kim SW. Bioreducible polymers with cell penetrating and endosome buffering functionality for gene delivery systems. *J Control Release*. 2011 May 30;152(1):110–9.
  41. Brunetti-Pierri N, Ng P. Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther*. 2008 Apr;15(8):553–60.
  42. Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Beaudet AL, Carey KD, Finegold M, Ng P. Acute Toxicity After High-Dose Systemic Injection of Helper-Dependent Adenoviral Vectors into Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther*. 2004 Jan;15(1):35–46.
  43. Cress DE. The need for regulatable vectors for gene therapy for Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2008 Jan;209(1):30–3.
  44. Mandel RJ. CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*. 2010 Apr;12(2):240–7.
  45. Mejía-Toiber J, Castillo CG, Giordano M. [Cell and ex vivo gene therapy: advances in the treatment of central nervous system disorders]. *Rev Neurol*. 49(9):483–9.
  46. Mueller C, Flotte TR. Gene-Based Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013 Mar 7;10(sup1):44–9.



47. O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet.* 2006 Apr;7(4):261–76.
48. Knoell DL, Yiu IM. Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials. *Am J Health Syst Pharm.* 1998 May 1;55(9):899–904.
49. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
50. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Internet]. Available from: <http://www.abedia.com/wiley/>
51. Lane DP, Cheek CF, Lain S. p53-based Cancer Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Sep 1;2(9):a001222–a001222.
52. Rodríguez JA, Martínez LM, Cruz N, Cómbita AL. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. *Rev Colomb Cancerol.* 2014 Mar;18(1):27–40.
53. Dachs GU, Tupper J, Tozer GM. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs.* 2005 Apr;16(4):349–59.
54. Ren S-P, Wu C-T, Huang W-R, Lu Z, Jia X-X, Wang L, et al. Adenoviral-mediated transfer of human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes results in growth suppression and autologous anti-tumor cytotoxicity of multiple myeloma cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Apr 2;55(4):375–85.
55. Ahn WS, Bae SM, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Chun HJ, et al. Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol.* 2004 Feb;92(2):611–21.
56. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Yoo JY, Seo Y-S, et al. Anti-cancer effect of adenovirus p53 on human cervical cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer.* 2004 Mar;14(2):322–32.
57. Yang C, Cirielli C, Capogrossi MC, Passaniti A. Adenovirus-mediated wild-type p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of prostatic tumor cells. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4210–3.

- 
58. El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7486–95.
  59. Inoue H, Shiraki K, Murata K, Sugimoto K, Kawakita T, Yamaguchi Y, et al. Adenoviral-mediated transfer of p53 gene enhances TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2004 Aug;14(2):271–5.
  60. Ma G, Shimada H, Hiroshima K, Tada Y, Suzuki N, Tagawa M. Gene medicine for cancer treatment: commercially available medicine and accumulated clinical data in China. *Drug Des Devel Ther*. 2009 Feb 6;2:115–22.
  61. INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy--introgen, RPR/INGN 201. *Drugs R D*. 2007;8(3):176–87.
  62. Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, Rodriguez JL, Smith JB, et al. Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013 Jun;24(2):55–64.
  63. Büning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Mol Med*. 2013 Jan;5(1):1–3.
  64. Wang J, Lu X-X, Chen D-Z, Li S-F, Zhang L-S. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2004 Feb 1;10(3):400–3.
  65. Chen L, Waxman DJ. Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Curr Pharm Des*. 2002;8(15):1405–16.
  66. Huang Q, Pu P, Xia Z, You Y. Exogenous wt-p53 enhances the antitumor effect of HSV-TK/GCV on C6 glioma cells. *J Neurooncol*. 2007 Apr 11;82(3):239–48.
  67. Huang H, Tan W, Zhu W, Liang Z. [Lethal effect of adenovirus-mediated HSV-TK gene in combination with hydroxycamptothecin on human bladder cancer in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007 Apr;27(4):461–4.
  68. Kagaya T, Nakamoto Y, Sakai Y, Tsuchiyama T, Yagita H, Mukaida N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene delivery enhances antitumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in a model of colon cancer. *Cancer Gene Ther*. 2006 Apr 14;13(4):357–66.

69. Luo X-R, Li J-S, Niu Y, Miao L. Adenovirus-mediated double suicide gene selectively kills gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(3):781–4.
70. Määttä A-M, Tenhunen A, Pasanen T, Meriläinen O, Pellinen R, Mäkinen K, et al. Non-small cell lung cancer as a target disease for herpes simplex type 1 thymidine kinase-ganciclovir gene therapy. *Int J Oncol.* 2004 Apr;24(4):943–9.
71. Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P, Chiocca EA, Viapiano MS. Strategies in gene therapy for glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2013 Oct 23;5(4):1271–305.
72. Sviatchenko VA, Tarasova M V, Netesov S V, Chumakov PM. [Oncolytic adenoviruses in anti-cancer therapy: current status and perspectives]. *Mol Biol (Mosk).* 46(4):556–69.
73. Alemany R, Balagué C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2000 Jul;18(7):723–7.
74. Vasey PA, Shulman LN, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, et al. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Mar 15;20(6):1562–9.
75. Chen G-X, Zhang S, He X, Liu S, Ma C, Zou X-P. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *Onco Targets Ther.* 2014 Oct;1901.
76. Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):289–98.
77. Dias JD, Liikanen I, Guse K, Foloppe J, Sloniecka M, Diaconu I, et al. Targeted Chemotherapy for Head and Neck Cancer with a Chimeric Oncolytic Adenovirus Coding for Bifunctional Suicide Protein FCU1. *Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2540–9.

- 
78. Predina JD, Judy B, Aliperti LA, Fridlender ZG, Blouin A, Kapoor V, et al. Neoadjuvant in situ gene-mediated cytotoxic immunotherapy improves postoperative outcomes in novel syngeneic esophageal carcinoma models. *Cancer Gene Ther.* 2011 Dec 26;18(12):871–83.
  79. Delgado R, Regueiro BJ. El futuro en la infección por VIH: terapia génica y ARN de interferencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:68–75.
  80. Stan R, Zaia JA. Practical Considerations in Gene Therapy for HIV Cure. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014 Mar 22;11(1):11–9.
  81. Strayer D., Akkina R., Bunnell B., Dropulic B., Planelles V., Pomerantz R., et al. Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Mol Ther.* 2005 Jun;11(6):823–42.
  82. Wertz DC, Fletcher JC, Berg K. Review of Ethical Issues in Medical Genetics.
  83. Rapporteurs, Mr :, Edgar H, Tursz T. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture Report on Human Gene Therapy.
  84. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. *Boletín Of del Estado.* 2015;177(1):62935–3030.
  85. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, et al. Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. *Science* (80- ). 2009 Jul 24;325(5939):433–433.
  86. Cirión AE. Algunas pinceladas de las leyes españolas sobre Genética. *Opinión Jurídica Univ Medellín.* 2003;2(3).
  87. ONU. LOS DERECHOS HUMANOS DE LAS GENERACIONES FUTURAS. 2015;III:1–12.
  88. Del Rio M<sup>a</sup> A. Décimo aniversario de la entrada en vigor del Convenio de Oviedo. *Rev Bioética y Derecho - UB.* 2010;18.
  89. Andormo R. Invaluable Role of Soft Law - Deutsche UNESCO-Kommission [Internet]. Available from: <https://www.unesco.de/wissenschaft/bis-2009/invaluable-role-of-soft-law.html>

90. Flachowsky G. Human genetics: Choise and responsibility. *Anim Feed Sci Technol.* 2011;168(3–4):282–4.
91. Miyasaka M. Resourcifying human bodies--Kant and bioethics. *Med Health Care Philos.* 2005;8(1):19–27.
92. Cours des comptes. Rapport d'observations définitives de la Cour des comptes sur les comptes d'emploi 2002 à 2004 des ressources collectées auprès du public par le Secours Catholique. 2006. 127 p.
93. Bowman K. What are the limits of bioethics in a culturally pluralistic society? *J Law Med Ethics.* 2004;32(4):664–9.
94. Marco Regulatorio [Internet]. Available from: <http://www.setgyc.es/Informaci%25C3%25B3n-de-Inter%25C3%25A9s/Marco-Regulatorio.aspx>.
95. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios - Investigación Clínica - Terapias avanzadas - Preguntas y respuestas sobre regulación de medicamentos de terapia avanzada [Internet]. Available from: [https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp\\_TA.htm](https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm)
96. Zanchet DJ, Montero EF de S. Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality description. *Acta Cir Bras.* 2002;17(6):381–7.
97. Xie C, Wang Q, Wang J, Tan B, Fan Z, Deng Z, et al. Developmental changes in hepatic glucose metabolism in a newborn piglet model: A comparative analysis for suckling period and early weaning period. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Feb;470(4):824–30.
98. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia.* 1998;4(4):331–4.
99. Frimmer M, Ziegler K. The transport of bile acids in liver cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 1988;947(1):75–99.
100. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50(10):1955–66.
101. Kumar A, Pal D. Green fluorescent protein and their applications in advance research. 2016;1(1).

- 
102. Seldon PM, Barnes PJ, Giembycz MA. Interleukin-10 does not mediate the inhibitory effect of PDE-4 inhibitors and other cAMP-elevating drugs on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  generation from human peripheral blood monocytes. *Cell Biochem Biophys*. 1998 Feb;29(1–2):179–201.
  103. Ireland SJ, Monson NL, Davis LS. Seeking balance: Potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10. *Cytokine*. 2015 Jun;73(2):236–44.
  104. Ferraro S SA. Determinación del perfil metabólico en cerdas adultas Landrace-Largewhite. *Gac Ciencias Vet*. 2004;9(2):63–8.
  105. Home - Genome - NCBI [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>
  106. Lodish H. *Molecular Cell biology*. 4th ed. New York; 2000. Chapter 3.
  107. Brown T. *Genomes*. 2nd ed. 2002. Chapter 3.
  108. Węgrzyn G. What does “plasmid biology” currently mean? *Plasmid*. 2005 Jan;53(1):14–22.
  109. Wang Z, Jin L, Yuan Z, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria. *Plasmid*. 2009 Jan;61(1):47–51.
  110. Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ. Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2004 Mar;4(1):89–113.
  111. Russell PJ. *iGenetics: A Mendelian Approach* by iGenetics. 2006.
  112. Schmid F-X. *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
  113. Belghiti J, Noun R, Zante E, Ballet T, Sauvanet A. Portal triad clamping or hepatic vascular exclusion for major liver resection. A controlled study. *Ann Surg*. 1996 Aug;224(2):155–61.

114. Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic A V., Lai M, Knight S, Sabouri-Ghomi M, et al. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet.* 2015 Dec 2;6.
115. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *PCR Protocols.* New Jersey: Humana Press; p. 3–6.
116. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics.* 2007 Jun;8(4):234–51.
117. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999 Jan;26(1):112–22, 124–5.
118. Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther.* 2003 Jan;10(2):131–42.
119. Chapman GD, Lim CS, Gammon RS, Culp SC, Desper JS, Bauman RP, et al. Gene transfer into coronary arteries of intact animals with a percutaneous balloon catheter. *CircRes.* 1992;71(1):27–33.
120. Davern TJ. Molecular therapeutics of liver disease. *Clin Liver Dis.* 2001 May;5(2):381–414, vi.
121. Fabre JW, Grehan A, Whitehorne M, Sawyer GJ, Dong X, Salehi S, et al. Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther.* 2008 Mar 15;15(6):452–62.
122. Al-Dosari MS, Knapp JE, Liu D. Activation of Human CYP2C9 Promoter and Regulation by CAR and PXR in Mouse Liver. *Mol Pharm.* 2006 Jun;3(3):322–8.
123. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999 Jul;6(7):1258–66.
124. 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 Jul 25;7(15):1344–9.
125. Aliño SF, Crespo A, Dasí F. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther.* 2003 Sep;10(19):1672–9.

- 
126. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet.* 2013 Mar 12;14(4):295–300.
  127. Khorsandi SE, Bachellier P, Weber JC, Greget M, Jaeck D, Zacharoulis D, et al. Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther.* 2008 Apr 8;15(4):225–30.
  128. Fabre JW, Whitehorne M, Grehan A, Sawyer GJ, Zhang X, Davenport M, et al. Critical Physiological and Surgical Considerations for Hydrodynamic Pressurization of Individual Segments of the Pig Liver. *Hum Gene Ther.* 2011 Jul;22(7):879–87.
  129. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther.* 2006 Dec 27;13(24):1696–702.
  130. 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.
  131. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Parameters Affecting Image-guided, Hydrodynamic Gene Delivery to Swine Liver. *Mol Ther Acids.* 2013 Oct 15;2(10):e128.
  132. Aliño SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasí F, Sánchez M. Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism. *Gene Ther.* 2007 Feb 12;14(4):334–43.
  133. de Groot GH, Reuvers CB, Schalm SW, Boks AL, Terpstra OT, Jeekel H, et al. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res.* 1987 Jan;42(1):92–100.
  134. Lee KU, Zheng L, Cho YB, Kim K-H, Ha J, Suh K-S, et al. An Experimental Animal Model of Fulminant Hepatic Failure in Pigs. *J Korean Med Sci.* 2005;20(3):427.
  135. Sawyer GJ, Dong X, Whitehorne M, Grehan A, Seddon M, Shah AM, et al. Cardiovascular function following acute volume overload for hydrodynamic gene delivery to the liver. *Gene Ther.* 2007 Aug 14;14(16):1208–17.
  136. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science (80- ).* 2011 Nov 25;334(6059):1081–6.



137. Cagnello M, Tcherkezian J, Dorn JF, Huttlin EL, Maddox PS, Gygi SP, et al. 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 15;32(22):4572–84.
138. Brikci-Nigassa L, Matsuyama M, Hase T, Eljaafari A, Chargui J, Sanhadji K, et al. 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.



# Anexos

---



## 10. ANEXOS

### 10.1 ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Vectores virales más utilizados.
- Tabla 2. Enfermedades monogénicas tratadas con terapia génica.
- Tabla 3. Ejemplos de ensayos clínicos realizados con distintos tipos de terapia génica para el cáncer.
- Tabla 4. Características definitorias de los modelos quirúrgicos.
- Tabla 5. Variables estudiadas.
- Tabla 6. Tiempos del procedimiento quirúrgico.
- Tabla7. Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 1.
- Tabla8. Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 1
- Tabla9. Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 2.
- Tabla10. Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 2.
- Tabla11. Parámetros hemodinámicos del modelo quirúrgico 3.
- Tabla 12. Niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en el modelo quirúrgico 3

---

## 10.2. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según continentes
- Figura 2. Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según la fase en que se encuentran.
- Figura 3. Proporción de ensayos clínicos de terapia génica según el tipo de enfermedad a los que están enfocados.
- Figura 4. Mecanismo de microinyección.
- Figura 5. Mecanismo por Microproyectiles.
- Figura 6. Mecanismo de electroporación.
- Figura 7. Inyección hidrodinámica.
- Figura 8. Vectores empleados en terapia génica. Ensayos clínicos.
- Figura 9. Anatomía hepática del cerdo y vesícula biliar.
- Figura 10. Segmentos hepáticos y vascularización portal del cerdo.
- Figura 11. Anatomía venas suprahepáticas del cerdo.
- Figura 12. Parénquima hepático y sus distintos tipos celulares.
- Figura 13. Lobulillo hepático o clásico.
- Figura 14. Lobulillo portal.
- Figura 15. Acino hepático.
- Figura 16. Espacio Porta.
- Figura 17. A) Colocación del catéter en la arteria femoral. B) Colocación del catéter venoso central.

- Figura 18. Material para la realización del procedimiento.
- Figura 19. Laparotomía y exposición de estructuras.
- Figura 20. Toma de muestras del tejido hepático.
- Figura 21. A) Arteria hepática. B) Vena porta. C) Vena cava inferior.
- Figura 22. Vena cava porción suprahepática
- Figura 23. Modelo quirúrgico 1.
- Figura 24. Modelo quirúrgico 2.
- Figura 25. Modelo quirúrgico 3.
- Figura 26. Cierre de laparotomía media
- Figura 27. Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena cava y porta simultáneamente (MQ1) a distintas velocidades y volúmenes.
- Figura 28. Índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena porta y cava simultáneamente (MQ1) a distintas velocidades y volúmenes.
- Figura 29. El grafico de la izquierda muestra el índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena cava (MQ2) a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml y el grafico de la derecha muestra el Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena cava (MQ2) a una velocidad de 20 ml/s.
- Figura 30. El grafico de la izquierda muestra el índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena cava (MQ2) a una velocidad de perfusión de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml. El grafico de la derecha muestra la transcripción del gen eGFP al tejido hepático por la vena cava (MQ2) a una velocidad de perfusión de 20 ml/s con un volumen de 200 ml.

- 
- Figura 31. En la gráfica de la izquierda se muestra el índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de perfusión de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml. En el gráfico de la derecha se muestra el índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 32. En la gráfica de la izquierda se muestra el índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por vena porta (MQ3) a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml. En el grafica de la derecha se muestra el índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático por Vena Porta (MQ3) a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 33. Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 34. Índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 10 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 35. Índice de entrega del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 36. Índice de transcripción del gen eGFP al tejido hepático comparando el MQ2 y MQ3 a una velocidad de 20 ml/s y con un volumen de 200 ml.
- Figura 37. Índice de traducción del gen eGFP.
- Figura 38. Índice de entrega aparente del gen hIL-10.
- Figura 39. Índice de transcripción del gen hIL-10.
- Figura 40. Índice de traducción a aparente del gen hIL-10
- Figura 41. Niveles de hIL-10 en plasma



## 10.3. PUBLICACIONES

European  
Surgical  
Research

Eur Surg Res 2013;51:47–57

DOI: 10.1159/000351339

Received: January 28, 2013

Accepted after revision: April 1, 2013

Published online: September 10, 2013

© 2013 S. Karger AG, Basel  
0014–312X/13/0512–0047\$38.00/0  
www.karger.com/esr

Original Paper

## A Surgical Model for Isolating the Pig Liver in vivo for Gene Therapy

O. Carreño<sup>a</sup> L. Sendra<sup>b</sup> E. Montalvá<sup>a</sup> A. Miguel<sup>b</sup> F. Orbis<sup>a</sup> M.J. Herrero<sup>b,c</sup>  
I. Noguera<sup>e</sup> S.F. Aliño<sup>b-d</sup> R. Lopez-Andujar<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante, Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, <sup>c</sup>Unidad de Farmacogenética, IIS La Fe, Servicio de Farmacia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

<sup>d</sup>Unidad de Farmacología Clínica, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, and <sup>e</sup>SCSIE, Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

### Abstract

Several studies report results that suggest the need of vascularization blocking for efficient gene transfer to the liver, especially in nonviral gene therapy. In this study, we describe a surgical strategy for in vivo isolation of the pig liver, resulting in a vascular watertight organ that allows the evaluation of several gene injection conditions. The hepatic artery and portal, suprahepatic and infrahepatic cava veins were dissected. Then, liver vascularization was excluded for 5–7 min. In that time, we first injected 200 ml saline solution containing the p3c-eGFP plasmid (20 µg/ml) simultaneously through two different catheters placed in the portal and cava veins, respectively. Vital constants were monitored during the surgery to assess the safety of the procedure. Basal systolic/diastolic blood pressures were 92.8/63.2 mm Hg and dropped to 40.7/31.3 mm Hg at the end of vascular exclusion; the mean basal heart rate was 58 bpm, reaching 95 bpm when the blood pressure was low. Oxygen saturation was maintained above 98% during the intervention, and no relevant changes were observed in the ECG tracing. Peak plasma AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) levels were observed after 24 h (151 and 57 IU, respectively). These values were higher, but not relevant, in 60 ml/s injection than in 20 ml/s injection. Efficiency of gene transfer was studied with simultaneous (cava and portal veins) injection of eGFP gene at flow rates of 20 and 60 ml/s. Liver tissue samples were collected 24 h after injection and qPCR was carried out on each lobe sample. The results confirmed the efficiency of the procedure. Gene delivery differed between 20 ml/s (9.9–31.0 eGFP DNA copies/100 pg of total DNA) and 60 ml/s injections (0.6–1.1 eGFP DNA copies/100 pg of total DNA). Gene transcription showed no significant differences between 20 ml/s (15,701.8–21,475.8 eGFP RNA copies/100 ng of total

Dr. S.F. Aliño  
Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina, Universidad de Valencia  
Avda Blasco Ibañez 15, ES–46010 Valencia (Spain)  
E-Mail alino@uv.es

KARGER

Downloaded by:  
Vieling S. KARGER AG BASEL  
172.16.147.127/11/2013 5:28:57 PM

RNA) and 60 ml/s (12,014–36,371 eGFP RNA copies/100 ng of total RNA). The procedure is not harmful for animals and it offers a wide range of gene delivery options because it allows different perfusion ways (anterograde and retrograde) and different flow rates to determine the optimal conditions of gene transfer. This strategy permits the use of cell therapy and viral or non-viral liver gene therapy, especially appropriated to a wide variety of inherited or acquired diseases because of the liver's ability to produce and deliver proteins to the bloodstream.

© 2013 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Most circulating serum proteins are synthesized within the liver and then delivered to the bloodstream where they are shipped to their specific site of action. There is a group of diseases in which the pathology is caused by a fault in a single protein, coded by a single gene. This fault causes the protein encoded by this gene to be wrong, affecting to its correct function and developing the illness. Gene therapy is a type of treatment that aims to use genes as drugs, and offers a huge therapeutic potential that has barely been exploited in routine clinical practice. Gene therapy can play an important role [1] in the treatment of these diseases because the correct gene encoding the adequate protein could be transferred to where the defective protein is produced and improve the pathology. These features make the liver an optimal target [2] for gene therapy. Its size and protein synthesis ability would empower the liver [3] to produce physiologic and/or therapeutic molecules usually formed elsewhere. Determining an efficient systematic model of gene transfer would open a wide range of possibilities, such as transferring therapeutic genes to patients with a deficiency in the expression of such genes [4], silencing genes in patients with upregulated gene expression [5], or developing a strategy [6] to treat patients with a viral infection. These different strategies allow the covering of a wide variety of diseases. This broad spectrum of possibilities underscores the capital importance of developing a systematic, efficient and safe model of gene transfer which would permit us to step up to the clinical setting in humans.

Extensive experience has been gained in nonviral gene therapy since gene transfer was demonstrated to be safe and efficient in mice with the injection of a large volume of plasmid solution (hydrodynamic) via the caudal vein [7, 8]. Therapeutic plasma levels (>1 mg/ml) of human  $\alpha_1$ -antitrypsin protein were reached for longer than 6 months [9]. These results led the scientists to conduct their studies to develop a similar model applicable to larger animals more similar to humans, such as pigs. Several approaches [10–12] of noninvasive catheter-mediated retrovenous injection in individual liver lobes were evaluated. Results of these studies demonstrated effective gene transfer but much lower as compared with the murine model. This poor efficiency was a consequence of the low pressure reached within the liver. This may have been due to the high elasticity of the liver tissue, as deduced from studies of efficient hydrodynamic gene transfer in less elastic tissues such as cardiac tissue in pigs [13], or could have been due to outflow of the injected solution into other vessels. Sawyer et al. [14] demonstrated that an in vivo pressurized liver model is required in order to reach an intrahepatic pressure high enough for efficient gene transfer [15]. This idea has been confirmed in a study [16] in which a high expression of eGFP protein was reached in the pig liver through balloon-catheter retrovenous injection in individual liver lobes following vascular exclusion. Kamimura et al. [17] adopted a similar approach and reported high levels of luciferase activity taking into consideration the obstruction of outflow. Protein expression occurs mainly in the perfused area. Our group [18] followed this line, employing watertight human liver segments. The latter were obtained from surgical resection, and consequently



resulted in vascular watertight tissue. Retrovenous ex vivo catheter-mediated injection of an eGFP gene solution was carried out, and gene expression data showed high efficiency of the transfer model. In summary, results suggest that retrograde injection and outflow blockade is needed for efficient gene transfer. In the present study, we describe a safe surgical model for the in vivo obtainment of watertight whole liver allowing anterograde, retrograde or simultaneous injection of therapeutic solution. This model allows analysis and comparison of system efficiency under different conditions and offers potential clinical applications, since it represents standardization of safe and efficient in vivo gene transfer in the liver – the latter being the most appropriate organ, since it is the main producer of serum proteins for the entire body.

## Material and Methods

### Animals

Female pigs were obtained from a farm working for the Health Research Institute (IIS) of La Fe Hospital (Valencia, Spain), and were housed in individual pigsties. The experiments were approved by the Animal Biological Research Ethics Committee of the Hospital La Fe.

Anesthesia of the pigs (18–23 kg) was induced with ketamine (Imalgene 100, Merial, France; 5–10 mg/kg i.m.), midazolam (Hospira 1 mg/ml, Madrid, Spain; 0.3 mg/kg i.m.) and propofol (Lipuro 2%, Braun, Melsungen, Germany; 4–6 mg/kg i.v.), and was maintained with sevoflurane (Sevorane, Abbott Laboratories, Madrid, Spain; 2.5%, inhalatory). Muscle relaxation was induced with vecuronium bromide (Norcuron 10 mg; 0.08 mg/kg i.v.). Morphine (0.4 mg/kg i.v.) was administered for intraoperative analgesia and buprenorphine (Buprex, Schering-Plough, Madrid, Spain; 0.02 mg/kg i.v.) for postoperative analgesia. Vital constants were monitored throughout the intervention. The pigs were sacrificed 24 h after the operation using potassium chloride (Braun 2 mEq, 20 mEq i.v.) after sedation. Blood samples (2 ml) were collected from an ear vein at 0 h (before plasmid injection), 1 h after injection and 24 h after injection before sacrifice. The liver was extracted and representative tissue samples of each lobule were collected for further analysis.

### Surgical Equipment

Surgical laparotomy equipment, vessel loops (DEVON™, Covidien) for referencing vascular structures and clamps were required. We used three types of sutures, Biosyn™ 5/0 (Covidien) for vena cava, Prolene™ 6/0 (Ethicon) for portal vein, and Dexon™ 2/0 (Covidien) for closing the abdominal wall. Staples were used to close the skin.

### Plasmid Construction

The plasmid p3c-eGFP (6.45 kb), containing the enhanced green fluorescent protein complementary DNA (cDNA) driven by pCMV (cytomegalovirus) promoter, was constructed by cloning eGFP into the *Hind*III site of pcDNA3 (Invitrogen, Barcelona, Spain), excised from peGFP-N1 (4.7 kb) plasmid vector (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, France).

### In vivo Gene Transfer to Pig Liver

Two 14-Fr catheters (Bicakcilar, Istanbul, Turkey) were placed in the cava and portal veins for simultaneous gene transfer. After catheter fixation with needle and thread, a solution containing the eGFP plasmid (20 µg/ml) was injected with a high volume pump at different flow rates and a volume of 400 ml (approx. 1/1 of the organ weight according to body weight). Tissue samples were obtained from perfused areas. Tissue samples <1 mm in thickness were subsequently collected under sterile conditions and stabilized in RNAlater solution (Ambion). Samples were removed 1 day after collection and processed for molecular analysis to evaluate delivery efficiency and gene expression.

### Quantitative PCR and RT-PCR

Two samples were taken from each every four liver lobes. Tissue samples were cut into small pieces and homogenized in RLT buffer (Qiagen®, Barcelona, Spain) with an Ultra-Turrax homogenizer (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany). Further purification with the RNeasy midi kit (Qiagen) was performed before spectrophotometric quantification. RNA retrotranscription to cDNA was carried out using 1 µg total

RNA (DNA free), random hexamers and a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For quantitative real-time qPCR, power SYBR GreenPCR master mix (Applied Biosystems) was employed according to the instructions of the manufacturer.

Oligonucleotides were designed with Primer Express software (Applied Biosystems). The specific primers for eGFP were:

Forward: 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3', Temperature: 53.9°C

Reverse: 5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGGG-3', Temperature: 54.9°C

The precise amount of RNA (based on optical density readings) and its quality (lack of degradation) were normalized with respect to an endogenous control gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). In any case, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression was employed as the endogenous gene control but only as a comparison for testing that correct RNA quantities were being employed. Quantitative data were calculated as the number of DNA or RNA copies on a regression curve employing the plasmid containing the eGFP gene. The copy number of eGFP DNA and RNA was always performed on standard curves of the same gene. Data graphical plotting was performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, Calif., USA).

## Results

### *Surgical Technique*

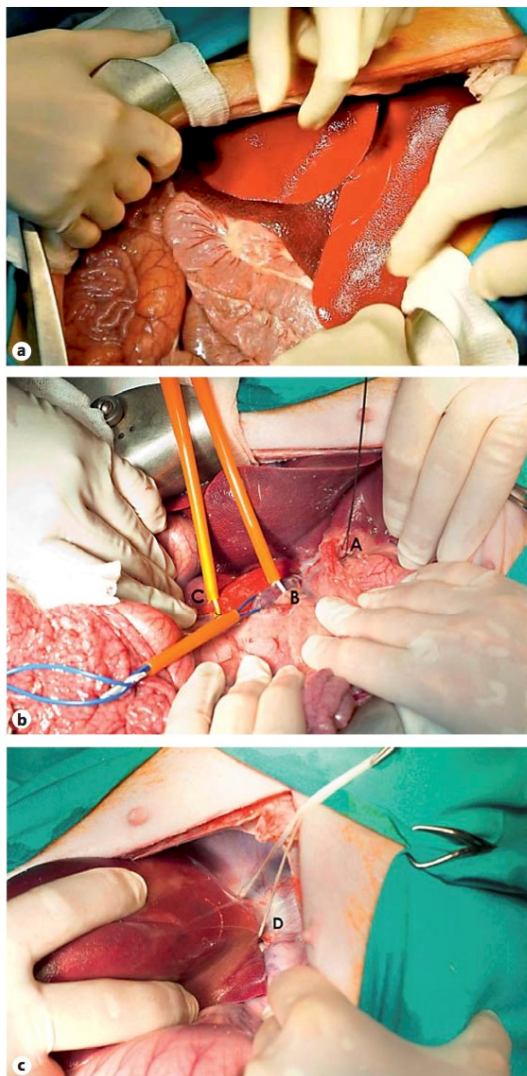
Premedication was performed with an intramuscular injection of ketamine chloride. After injecting propofol, the animals were intubated and ventilated with a mixture of nitrous oxide, oxygen and sevoflurane. One catheter was placed in the external jugular vein for infusion and blood sampling, and another catheter was placed in the femoral artery for blood pressure monitoring. A complete midline laparotomy was carried out, exposing all the abdominal organs (fig. 1a). The general dissection and exposure of the structures were similar in all cases (fig. 1b). Cannulation differed depending on the injection models. By mobilizing the intestinal package towards the left, the extrapancreatic portal vein was exposed and encircled with one or two vessel loops, depending on the cannulation model involved. The hepatic artery was identified in the hepatic ileum and was referenced with a silk ligature. The inferior vena cava above the renal veins was dissected and referenced with two vessel loops to create a closed segment in the vena cava for cannulation. To encircle the suprahepatic vena cava and the hepatic veins with a vessel loop, liver mobilization by sectioning the retroperitoneal ligaments was required. Likewise, to encircle the suprahepatic vena cava and the hepatic veins with a vessel loop, liver mobilization by sectioning the retroperitoneal ligaments was again necessary (fig. 1c).

This surgical technique allows us to establish three models of perfusion in total hepatic vascular occlusion (fig. 2). In model 1, cannulation is performed through the portal vein and vena cava simultaneously, in model 2 only perfusion through the vena cava is performed, and in model 3 only the portal vein is perfused.

In model 1, and after identifying and referencing all the vascular structures, we proceed to clamp the veins with vascular tourniquets and the hepatic artery with a bulldog clamp. The sequence is as follows: first hepatic artery, then portal vein, and finally infrahepatic vena cava, to interrupt hepatic inflow. The suprahepatic vena cava is clamped last, to obtain total hepatic vascular exclusion. Two longitudinal incisions are made on the anterior surface of the portal vein and the infrahepatic vena cava in the gap between both vessel loops, and the perfusion cannulas are then inserted in each vein.

In model 2, only the infrahepatic vena cava is cannulated and perfused. The initial steps for securing total liver vascular exclusion are similar to those in model 1. The portal vein is clamped, and only a longitudinal incision is made on the anterior surface of the cava vein to insert the perfusion cannula.





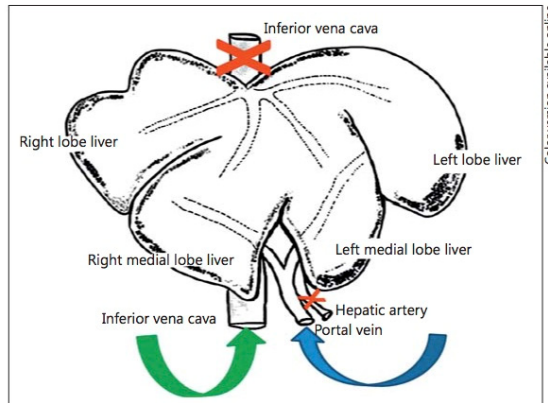
Color version available online

**Fig. 1.** Surgical steps. **a** Complete midline laparotomy, exposing all abdominal organs. **b** All the structures are referenced with vessel loops to create a closed segment in the vena cava for cannulation of the vessel. A = Hepatic artery; B = portal vein; C = infrahepatic inferior cava vein. **c** Mobilization of the liver by sectioning the retroperitoneal ligaments. D = Suprahepatic inferior cava vein.

In model 3, the process is the same as in model 2, but with clamping of the vena cava and perfusion through the portal vein.

After solution perfusion, the liver is kept under total vascular exclusion for 5 min to allow gene penetration of the cell nuclei. During this time, the incisions of the veins are sutured with interrupted Biosyn 5/0 (vena cava) or Prolene 6/0 (portal vein), starting with the portal vein.

KARGER



**Fig. 2.** Watertight liver and injection model (anterograde, retrograde, simultaneous). Depending on the injection model involved, one of the veins is sealed.

**Table 1.** Surgery time

Surgical step	Time employed, min ( $\pm$ SD)
Preparation	28.7 $\pm$ 8.9
Ischemia	7.8 $\pm$ 1.9
Incubation	4.6 $\pm$ 0.7
Closure	12.7 $\pm$ 3.7
Complete intervention	49.4 $\pm$ 11.8

Preparation time = Time from start to injection; ischemia time = total time of hepatic vascular exclusion; incubation time = time of permanence of plasmid in sealed liver; closure time = time from revascularization to the end of the operation; total intervention time = sum of the times of all the surgical steps.

Progressive declamping is carried out in the reverse sequence, first allowing liver outflow and finally inflow through the portal and cava veins.

Hemostasis is checked and the abdominal wall is closed with Dexon 2. The animal is then woken up and sacrificed after 24 h in order to carry out the molecular analysis of the liver lobe samples. This model requires a short space of time as shown in detail in table 1.

#### Hemodynamic Parameters

Hemodynamic parameters were continuously monitored (table 2) to determine the condition of the animal and ensure the safety of the procedure. Results show a blood pressure decline during liver isolation due to block of venous return, but this proved reversible, and the pressure recovered within a few minutes after revascularization. No important ECG changes were observed, and oxygen saturation was permanently maintained over 98%.

#### Molecular Analysis

We used model 1 to evaluate the general efficiency of this procedure for gene transfer. In these experiments, 400 ml of DNA solution were injected and two different flow rates (20 and 60 ml/s) were tested. Gene delivery and transcription were studied in each liver lobe sample.

KARGER

**Table 2.** Hemodynamic parameters during surgery

Surgical step	Hemodynamic parameters				
	systolic pressure, mm Hg	diastolic pressure, mm Hg	heart rate, bpm	SatO <sub>2</sub> , %	ECG
Basal	92.8±10.0	63.2±9.9	58–60	>98	no change
Vascular exclusion					
Preinjection	46.9±10.0	37.0±6.2	85–88	>98	no change
Injection	59.7±5.6	43.8±4.3	80–84		
Revascularization					
0 min	40.7±5.0	31.3±4.0	89–95		
1 min	77.7±15.9	53.3±10.3	75–80		
2 min	83.8±12.6	57.0±6.3	74–78		
3 min	82.5±20.9	60.2±22.3	72–75	>98	no change
5 min	85.7±7.1	56.0±4.0	70–74		
10 min	93.8±5.5	59.2±2.0	60–63		

Hemodynamic parameters were monitored during the entire intervention. These parameters do not depend on injection conditions but on hepatic vascular exclusion and show low dispersion. Liver isolation lasted no more than 5 min, followed by injection with plasmid solution, which was incubated during 5 min or less. The pigs were subsequently revascularized. Complete recovery occurred in under 5 min.

**Table 3.** eGFP gene delivery index

Liver injection flow rate	Gene delivery index, eGFP DNA copies/100 pg total DNA	
	20 ml/s	60 ml/s
Right lateral	11.2±1.9	0.6±0.5
Right medial	9.9±0.6	0.7±0.2
Left medial	31.0±20.6 <sup>*,‡</sup>	1.1±0.2*
Left lateral	10.7±0.3	0.7±0.1

Pigs were injected with p3c-eGFP plasmid solution and 24 h later were sacrificed and liver tissue samples were collected from different lobes. Samples were homogenized and DNA was purified. Then, qPCR was carried out to quantify eGFP DNA. Data expressed as eGFP DNA in 100 pg of total DNA. Statistical significance by two-way analysis of variance (ANOVA) analysis and Bonferroni posttest was found in groups marked with \*  $p < 0.05$  compared with 20 ml/s flow rate group, in groups marked with †  $p < 0.05$  compared with right medial (20 ml/s) and in groups marked with ‡  $p < 0.05$  compared with left lateral in 20 ml/s rate.

For gene delivery, two tissue samples (approx. 100 mg weight) were collected from the distal and proximal areas of each liver lobe and were homogenized. DNA was isolated and purified. qPCR indicated that gene delivery was 10–30 times higher with the 20 ml/s flow rate (9.9–31.0 eGFP DNA copies/100 pg total DNA) than with the 60 ml/s flow rate (0.6–1.1 eGFP DNA copies/100 pg total DNA) (table 3). These data indicate that a larger amount of plasmid was captured in tissue when injection was performed at 20 ml/s than at 60 ml/s and this could be due to the differential elasticity of the liver respect to the volume of hydrodynamic injection. We believe that higher flow rates could expand the vessels and allow the anadromous sense of circulation of the blood escaping from the liver. Gene delivery was higher in the left medial lobe with both flow rates.



**Table 4.** eGFP gene transcription index

Liver injection flow rate	Gene transcription index, eGFP RNA copies/100 ng total RNA	
	20 ml/s	60 ml/s
Right lateral	15,701.8±5,214.7	12,014.6±6,490.6
Right medial	16,619.7±4,676.9	24,358.4±0.0
Left medial	21,475.8±14,868.0	24,000.3±17,734.8
Left lateral	17,556.6±9,926.0	36,371.6±0.0

Pigs were injected with p3c-eGFP plasmid solution and sacrificed 24 h later; liver tissue samples were collected from different lobes. Samples were homogenized and RNA was purified. Then, qPCR was carried out to quantify eGFP RNA. Data expressed in eGFP RNA copies in 100 ng of total RNA. No statistically significant differences were observed between groups by two-way ANOVA and Bonferroni posttest.

For gene transcription analysis, two tissue samples (proximal and distal) were collected from every single lobe and RNA was extracted and purified. RT-PCR was performed to reversely transcribe RNA into cDNA, and qPCR was carried out. The results (table 4) showed no relevant differences in gene expression between the two flow rates: 20 ml/s (15,701.8–21,475.8 eGFP RNA copies/100 ng total RNA) and 60 ml/s (12,014.6–50,411.1 eGFP RNA copies/100 ng total RNA), respectively. These data demonstrate that the 60 ml/s flow rate affords more efficient gene delivery, because genes are expressed as in the 20 ml/s flow rate but with fewer gene DNA copies. Injection at 60 ml/s showed a higher intrinsic efficacy as lower delivery index (table 3) achieved the same copy number of eGFP RNA than 20 ml/s flow rate. These results suggest that the availability for transcription (nuclear localization) of the DNA delivered at 60 ml/s was higher than at 20 ml/s. Further studies to unravel the cellular distribution of exogenous injected DNA are needed. Despite this fact, we prefer the milder 20 ml/s rate instead of the more efficient 60 ml/s flow rate, because the latter is too aggressive for liver tissue and causes limiting liver capsule distension with no benefit in terms of gene expression.

#### Liver Toxicity

The liver damage induced by surgically mediated gene transfer was evaluated by measuring plasma levels of ALT and AST. The results (table 5) indicate that the procedure mediates limited and transient liver damage. Accordingly, in both cases small increases in AST were observed 1 h after injection, with a return to near normal levels 1 day after in the operation with the 20 ml/s flow rate. The levels reached (<150 U/l) were not relevant in any case. The ALT concentrations remained unaltered.

#### Discussion

The liver is the main producer of biological molecules in the body. This makes it an ideal target for gene therapy [2, 3] because it contains the mechanisms needed for physiological molecule production and distribution through the bloodstream. Given these characteristics of the organ, it is necessary to develop a systematic strategy to secure efficient gene delivery, with a view to subsequent transfer to the setting of routine clinical practice.

Accordingly, several strategies have been developed to extend such therapy to human use.



**Table 5.** Aspartate and alanine aminotransferase liver enzymes levels

Enzyme	Sampling time, h	Injection flow rate		Normal values, IU
		20 ml/s	60 ml/s	
GOT/AST, IU	0	38	55	15–55
	1	74	107	
	24	36	151	
GPT/ALT, IU	0	29	34	21–46
	1	34	38	
	24	31	57	

The liver was excluded from vascularization and was injected with p3c-eGFP plasmid solution at two different flow rates (20 and 60 ml/s). Blood samples were collected before injection and again 1 and 24 h after injection. The main liver enzymes were determined.

Firstly, nonviral hepatic gene transfer was carried out in mice. Gene delivery was achieved by injecting large volumes of saline solution containing a tracer gene through the caudal vein at a fast flow rate (hydrodynamic injection). This injection was anterograde. Mice produced the protein encoded by the injected gene (luciferase) for 150 days, and gene expression was seen to decline throughout this period [7]. Long-term (6 months) subtherapeutic expression of human  $\alpha_1$ -antitrypsin protein was achieved by Zhang et al. [8]. Subsequently, our group likewise obtained expression of this protein at therapeutic concentrations for 6 months too [9]. In a further study [19], intravital microscopy was used to show that blood flow inversion occurs after injection, with the formation of endocytic vesicles. These results indicated that the pressure exerted by injection and venous return caused the augmentation of intrahepatic pressure, which favored gene solution penetration of the hepatocytes through the cell membrane.

Once expression was achieved in small laboratory animals, the next step consisted of transferring the model to larger animals more similar to humans, such as pigs. Different approaches were used to secure a closed space within the liver in vivo, in order to allow a pressure rise equivalent to that observed in smaller animals. Khorsandi et al. [10] performed balloon-catheter-mediated injection without outflow block, but the resulting gene delivery was not high enough to exert a therapeutic function, thus indicating that the blocking of losses was required. These results were confirmed by subsequent studies [16, 20, 21] in which outflow was blocked from the portal vein in order to pressurize the liver. In the literature, only individual liver segments have been subjected to vascularization block, and gene expression was circumscribed to the injected segment. It would be interesting to achieve efficient gene transfer to the whole liver, in order to produce systemic levels of the protein. A strategy in which the whole liver was watertight in vivo was needed, in which gene solution injection increases the intrahepatic pressure and the target genes effectively reach the hepatocyte nuclei. In the present paper we describe a surgical technique in which liver vascularization is blocked (i.e. the organ is made watertight) for a brief interval of time (<10 min) through vascular ligation in vivo. This procedure does not pose a risk for the animals, as evidenced by other authors [22, 23] who studied liver ischemia for longer periods of time. The technique is invasive (laparotomy) but also easy and rapid (<1 h), and proves harmless for the pigs. Blood pressure drops when the circulation is blocked, but this is followed by quick recovery (in 3 min) when the liver is revascularized. Sawyer et al. [24] described QRS segment prolongation after injecting 1–8% of weight volume at 100 ml/s flow rate in rats. In

our experiments, injecting a volume corresponding to approximately 100% of liver weight (2–3% of body weight) at flow rates of 20 and 60 ml/s, respectively, produced no ECG alterations, though the most aggressive conditions caused limiting extension of the liver capsule (close to rupture point). We evaluated liver toxicity by measuring liver enzyme production with the data showing only limited and transient (24 h) changes. Gene delivery was assessed in two individuals, and the results showed eGFP gene expression in each liver lobe. In sum, we have standardized a reproducible technique for safe and efficient hepatic transfer that may allow us to apply cell and/or viral or nonviral gene therapy techniques. We have developed a procedure of potential clinical use and several local and systemic applications transferable to other organs. Further studies are required to evaluate the optimum perfusion conditions for maximally efficient target gene expression. In our hands, the results obtained showed similar levels of eGFP transcription despite the low delivery achieved at a 60-ml/s flow rate. We consider the perfusion at 20 ml/s to be the optimum as RNA copies of the exogenous gene were similar to those of 60 ml/s but being a more secure model for the animal. Further studies employing mammalian genes would be needed to be able to evaluate the response obtained with clinical potentially applicable therapeutic products.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-27002) and the Generalidad Valenciana (AP-151/11).

#### Disclosure Statement

The present work contains no conflicts of interest, nor any publication material which would violate any copyright or other personal or proprietary rights of any person or entity.

#### References

- 1 O'Connor TP, Crystal RG: Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 2006;4:261–282.
- 2 Davern TJ: Molecular therapeutics of liver disease. *Liver Dis* 2001;52:381–414.
- 3 Strauss M: Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Ther* 1994;1:156–164.
- 4 Horwich AL: Inherited hepatic enzyme defects as candidates for liver-directed gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;168:185–200.
- 5 Bestor TH: Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 2000;105:409–411.
- 6 Song E, et al: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347–351.
- 7 Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258–1266.
- 8 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;7:1344–1349.
- 9 Aliño SF, Crespo A, Dasí F: Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther* 2003;10:1672–1679.
- 10 Khorsandi SE, Bachellier P, Weber JC, Greget M, Jaeck D, Zacharoulis D, Rountas C, Helmy S, Helmy A, Al-Waracky M, Salama H, Jiao L, Nicholls J, Davies AJ, Levicar N, Jensen S, Habib N: Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther* 2008;15:225–230.
- 11 Herrero MJ, Dasí F, Noguera I, Sanchez M, Moret I, Sanmartin I, Aliño SF: Mouse and pig nonviral liver gene therapy: success and trials. *Gene Ther Mol Biol* 2005;9:169–180.
- 12 Aliño SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasí F, Sánchez M: Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterisation. *Gene Ther* 2007;14:334–343.

- 13 Aliño SF, José Herrero M, Bodi V, Noguera I, Mainar L, Dasí F, Sempere A, Sánchez M, Díaz A, Sabater L, Lledó L: Naked DNA delivery to whole pig cardiac tissue by coronary sinus retrograde injection employing non-invasive catheterization. *J Gene Med* 2010;12:920–926.
- 14 Sawyer GJ, Zhang X, Fabre JW: Technical requirements for effective regional hydrodynamic gene delivery to the left lateral lobe of the rat liver. *Gene Ther* 2010;17:560–564.
- 15 Fabre JW, Grehan A, Whitehorne M, Sawyer GJ, Dong X, Salehi S, Eckley L, Zhang X, Seddon M, Shah AM, Davenport M, Rela M: Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther* 2008;15:452–462.
- 16 Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E: Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 2006;13:1696–1702.
- 17 Kamimura K, Suda T, Xu W, Zhang G, Liu D: Image-guided, lobe-specific hydrodynamic gene delivery to swine liver. *Mol Ther* 2009;17:491–499.
- 18 Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, Navarro V, Aliño SF: DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther* 2012;19:504–512.
- 19 Crespo A, Peydró A, Dasí F, Benet M, Calvete JJ, Revert F, Aliño SF, et al: Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Ther* 2005;12:927–935.
- 20 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;9:128–135.
- 21 Fabre JW, Whitehorne M, Grehan A, Sawyer GJ, Zhang X, Davenport M, Rela M: Critical, physiological and surgical considerations for hydrodynamic pressurization of individual segments of the pig liver. *Hum Gene Ther* 2011;22:879–887.
- 22 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;42:92–100.
- 23 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;20:427–432.
- 24 Sawyer GJ, Dong X, Whitehorne M, Grehan A, Seddon M, Shah AM, Zhang X, Fabre JW: Cardiovascular function following acute volume overload for hydrodynamic gene delivery to the liver. *Gene Ther* 2007;14:1208–1217.

---

## 10.4. VÍDEO