



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **“Estudio experimental de infección vírica en células humanas como alternativa a la terapia farmacológica”**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Enero 2018

**Autor: María Aracil Oncina**

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Diego Echevarría Aza

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1 ¿Qué es Terapia Génica? .....	6
2.1.1 ¿Qué relación tiene la terapia génica con la farmacia? .....	9
2.1.3 Tipos de patologías en las que se puede utilizar esta terapia.....	12
2.2. Terapia génica en España .....	13
2.2.1 Caso de terapia en la Comunidad Valenciana .....	14
2.3 Vectores de tipo viral.....	15
2.3.1 Tipos de virus en la terapia génica, .....	15
2.3.2 Lentivirus objeto de estudio de este trabajo de fin de grado.....	17
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>Error</b>
! Bookmark not defined.	
4.1 Línea celular objeto del material de este trabajo.....	19
4.1.1 Material.....	19
4.1.2. Protocolo .....	20
4.2 Preparación de cultivos celulares en cubreobjetos. ....	21
4.2.1 Material .....	21
4.2.2. Protocolo.....	21
4.3. Transfección del virus. ....	23
4.3.1 Material .....	23
4.3.2 Protocolo .....	24
4.4. Inmunofluorescencia.....	25
4.4.1. Material.....	25
4.4.2. Protocolo .....	26
4.5 Microscopía confocal. ....	27
4.6 Contaje de células infectadas. ....	28

<b>5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
5.1 Inmunocitología con fluorescencia.....	30
5.1.1 Concentración 1:100.....	30
5.1.2 Concentración 1:50 .....	31
5.1.3 Concentración 1:20 .....	31
5.1.4 Concentración 1:5.....	32
<b>6.CONCLUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>7.BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>



## 1. RESUMEN

La farmacogenómica es una disciplina en la ciencia que estudia las bases moleculares y genéticas de diversas patologías. Tiene como objetivo desarrollar nuevas vías de tratamiento. Una de estas vías es la terapia génica (TG). Dentro de la TG uno de los métodos es utilizar virus como vectores de infección modificados genéticamente.

El lentivirus es un tipo de retrovirus diploide, que infecta tanto células que se dividen como las que no se dividen y pueden permanecer en la célula hasta 6 meses, modificando si es necesario la expresión y el contenido proteico de un organismo.

En este trabajo experimental hemos utilizado una modificación del virus del SIDA (VIH 1; un tipo de lentivirus), dentro del cual, una de sus modificaciones es la adición de la secuencia de la green fluorescent protein (GFP).

El objetivo del trabajo ha sido estudiar la eficacia y eficiencia de infección y transmisión del virus en células embrionarias de riñón humano-HEK 293. Mediante el estudio de la concentración de inoculación del virus.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad la sociedad ha buscado distintas maneras de combatir las enfermedades desde un punto de vista fisiopatológico, sintomático y/o etiológico. Siendo este último el más efectivo, ya que una vez que se sabe la causa se puede curar definitivamente la patología. La etiología de una gran cantidad de patologías está en la existencia de uno o varios genes que o no funcionan bien o están totalmente dañados.

Nuestros genes están formados por ADN, estos se pueden encontrar en el núcleo celular principalmente. Los genes son los responsables, mediante proteínas transcritas a partir de estímulos, de movimientos, interacciones y funciones de las células. Por esta razón solo con la presencia de un pequeño cambio ya sea a nivel de un solo nucleótido o en una secuencia del gen, se pueden producir graves daños en el individuo tanto estructurales como metabólicos.

A partir del descubrimiento de la estructura del DNA gracias a Watson y Crick y su equipo, en los años 70 se pudo desarrollar la tecnología del DNA recombinante, esto proporcionó conocimientos y herramientas que permitían transferir genes al interior de las células, esto tenía un gran potencial como tratamiento de enfermedades.

Recientemente gracias a la fundación del proyecto Genoma Humano, que tenía como fin secuenciar y localizar los genes que existen en el genoma (se han estimado que son alrededor de unos 30.000), se han logrado bibliotecas de genes, los cuales se pueden fabricar a partir de técnicas de ingeniería genética.

El tratamiento consiste en la introducción de genes específicos en las células del paciente para combatir ciertas enfermedades se llama **terapia génica** (TG). Fue utilizada por primera vez en 1990, en un paciente que

padecía una inmunodeficiencia severa por un déficit de adenosin desaminasa. A partir de este caso se empezó a investigar alrededor de todo el mundo, pero no fue hasta finales de los 90 cuando esta clase de terapéutica tuvo éxito, fue en un grupo de niños también con inmunodeficiencia severa combinada (mutación en el gen que codifica la cadena gamma común) donde se realizó una transferencia *ex vivo* del gen alterado a las células de su medula. Esto les permitió tener una vida normal excepto dos de los sujetos que desarrollaron una leucemia aguda debido a la inserción aleatoria del gen. Esto aunque no fue un éxito absoluto, fue un paso esperanzador para pensar que la terapia génica es una terapia factible y muy útil en el futuro.

Por todo esto cada vez mas compañías farmacéuticas y centros de investigación de todo el mundo apuestan por estas técnicas revolucionarias. Se estima que se invierten billones de dólares en las investigaciones y experimentaciones de terapia génica.<sup>(1) (2)</sup>

## 2.1 ¿Qué es Terapia Génica?

La terapia génica es un conjunto de técnicas experimentales que permite poder transferir material genético ya sea ácidos nucleicos de ADN o ARN, con el objetivo de solucionar o prevenir las posibles patologías que se dan a causa de proteínas que puedan estar modificadas. <sup>(3)</sup> Hay diferentes tipos de Terapias Génicas:

1. Según a que células vaya dirigida:

-Terapia génica somática: aquella dirigida a modificar la genética de las células del organismo, es decir la que constituyen los tejidos del paciente. Esta terapia puede tener efectos duraderos pero no tiene consecuencias hereditarias<sup>(4)</sup>.

-Terapia génica germinal: a diferencia de la anterior esta terapia se dirige solo a las células reproductoras precursoras de óvulos y espermatozoides y a las células embrionarias de las primeras etapas del desarrollo. Por tanto estas

células no modificarían a los productores de estas células, si no a los descendientes de estos y a sus siguientes líneas de descendencia. Otra diferencia con la anterior es que no se practica en ningún país del mundo por principios éticos y morales ya que podría derivar en una selección artificial de genes que aportasen características ventajosas al individuo<sup>(5)</sup>.

## 2. Según el método que se utilice:

-Terapia *ex vivo*: son todos los protocolos donde primero las células son extraídas del paciente, se aíslan y se transfectan. Una vez que se ha visto que las células han sido correctamente transfectadas, se expanden en cultivo y se vuelven a introducir de nuevo en el paciente. Este método tiene como ventajas, que se puede elegir el tipo de célula que se quiere tratar, manteniendo un mayor control en el proceso y mayor eficacia. Sus desventajas serían el mayor coste y complejidad del protocolo, ya que podría existir una contaminación del tejido y la imposibilidad de tratar células de tejidos que no puedan crecer en cultivo.

-Terapia *in vivo*: agrupa los protocolos que transfieren directamente el material genético directamente al paciente. Este método tiene una gran ventaja la sencillez del proceso. Sus desventajas serían el menor control del proceso y su menor eficiencia ya que no se puede centrar la transferencia en un tipo de células específicas y tampoco se puede amplificar las células que si se han transferido correctamente.<sup>(6)</sup>

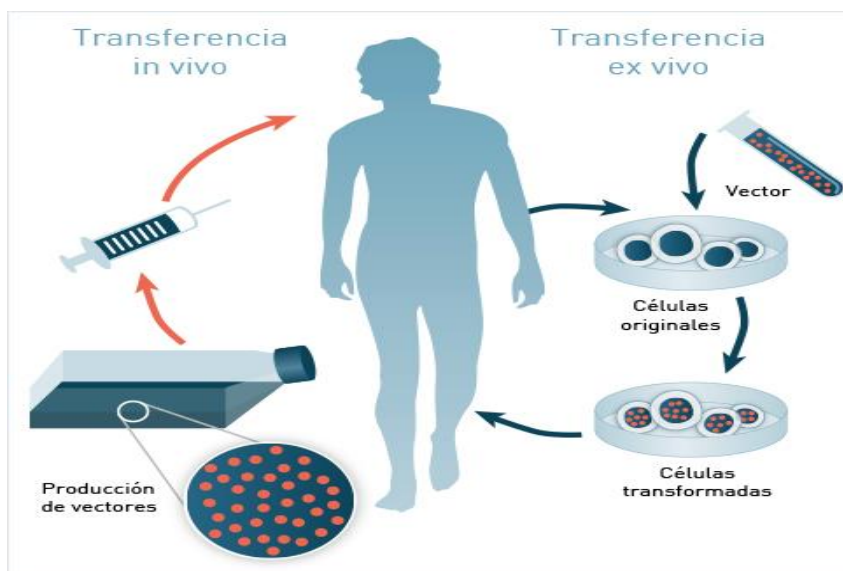


Figura 1. Diferencia entre la terapia in vivo ex vivo. En la in vivo las células se modifican dentro del cuerpo a partir del vector modificado genéticamente y en la terapia ex vivo, las células se modifican fuera del organismo, y

luego se vuelve a introducir.<sup>(7)</sup>

### 3. Según la estrategia de terapia génica:

-Inserción génica: es la más común y fácil. También llamada terapia de aumento génico (GAT). Esta técnica es la que se utiliza en enfermedades recesivas, en las que no se produce el material genético de forma normal. En este método se añade una copia de la variante no mutada del gen. Así se produce la proteína funcional en cantidad suficiente para restablecer un fenotipo sano y normal. Esta técnica es inútil para enfermedades con genes de carácter dominante.

-Corrección dirigida de mutaciones (gene targeting): es más laboriosa que la anterior. Este método se realiza mediante un procedimiento de modificación génica que sustituya, el gen o secuencia defectuoso por una copia sana. Así poder recuperar la función normal de dicho gen. El mecanismo que se utiliza es por recombinación homóloga. Aunque también podría ser posible una corrección a nivel de ARN empleándose ribozimas. Si se llegase a practicar esta técnica en humanos se podrían tratar enfermedades de carácter dominante.

-Supresión dirigida de células o inhibición dirigida de la expresión génica: en la supresión se insertan genes suicidas o genes que estimulen la respuesta inmune. Por otra parte, en la inhibición se bloquean directamente el ADN, ARN o la proteína que produzca el gen mutado. Se pueden realizar a estas técnicas mediante ADN antisentido o formación de hélices triples con oligonucleótidos de ADN. Ya se han experimentado tanto con los métodos de supresión para la eliminación de tumores cancerosos como con los métodos de inhibición para enfermedades infecciosas, ciertos tipos de cancer y enfermedades hereditarias de carácter dominante.<sup>(8)</sup>

Para realizar cualquiera de estas técnicas se requieren **vehículos o vectores** que transporten el material genético allá donde se necesite. Estos



vectores deben ser reproducibles y estables a la vez que deben ser inocuos o al menos que sus efectos secundarios sean lo más leves posible. Al igual que es importante que no induzcan una respuesta inmune. Por último también es imprescindible que los vectores tengan la capacidad de poder ser modificados genéticamente y que se pueda regular la expresión del gen que van a introducir.

Hay vectores de tipo viral y no viral. De tipo no viral como lo siguientes<sup>(9)</sup>:

-Bombardeo de partículas, esta técnica es utilizada tanto in vivo como ex vivo. Estas partículas son introducidas a partir de una descarga eléctrica o un pulso de gas directamente hacia el tejido.

-Inyección de ADN o ARN directamente en el tejido deseado. Este método es el más económico y menos toxico comparado con los vectores virales, la desventaja es que los niveles y la duración de la expresión del material genético perdura muy poco.

-Moléculas unidas al material genético, estas moléculas son vesículas formadas por una bicapa de lípidos, llamadas liposomas. Son reconocidas por los receptores de las células donde se quiere introducir este material y ayudan a que el material llegue a su objetivo y no queda diseminado por el organismo.

Los de tipo no viral se exponen en el punto 2.3.

### 2.1.1 ¿Qué relación tiene la terapia génica con la farmacia?

La farmacia es “la ciencia que enseña a preparar y combinar productos naturales o artificiales como remedios de las enfermedades, o para conservar la salud”. Y un medicamento es una sustancia que se utiliza para conservar la salud o combatir una enfermedad. Según la EMA (European medicines agency) los tratamientos de terapia génica son medicamento de terapia avanzada.<sup>(10)</sup>

Aunque sea un medicamento de terapia avanzada, al igual que otros tipos de medicamentos, para poder investigar sobre ellos necesitan ceñirse a la ley (Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de medicamentos y productos sanitarios, y al Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero) 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. Con 4 fases de investigación y siempre controlado por un comité ético de investigación clínica.<sup>(11)</sup>

Por lo tanto la relación que tiene la farmacia con la terapia génica es que tienen la misma finalidad si se observan las dos definiciones. La terapia génica puede solucionar problemas que la terapia farmacológica no puede. Hay muchas enfermedades de etiología genética o que simplemente administrando uno o varios principios activos no son suficientes para solucionarla, solo para paliar los daños o que la enfermedad no avance, como son ejemplos las enfermedades de diabetes o Huntington. La terapia génica podría erradicar estas enfermedades en el futuro.

Es decir la terapia génica podría ser una terapia alternativa a la farmacológica que de manera individual o en combinación con esta u otro tipos de terapias podría ser la cura de enfermedades que hasta ahora con las terapias de hoy en día no se ha podido lograr.

### 2.1.2 Terapia génica ¿futuro o realidad?

Actualmente alrededor del mundo se realizan 2597 estudios clínicos sobre terapia génica.

Sobre la terapia génica se investiga hoy en día en 38 países del mundo, ya que como se ha dicho anteriormente es la terapia que podría curar enfermedades que a día de hoy no tienen cura, por esto suscita gran interés. América es el continente que investiga mayoritariamente en este campo con un

64.9% del porcentaje mundial total, pero es Estados Unidos con un número de protocolos de 1643 el que abarca un 63.3% del porcentaje total y es el principal país del mundo en destacar.

Europa cuenta con un 23.2% del porcentaje mundial y es el Reino Unido el que desbunda con un total de 225 ensayos (8.5% del total mundial). Europa patentó su primer producto de terapia génica en el año 2012 (Glybera®) y actualmente se encuentran en funcionamiento 602 protocolos sobre este campo.

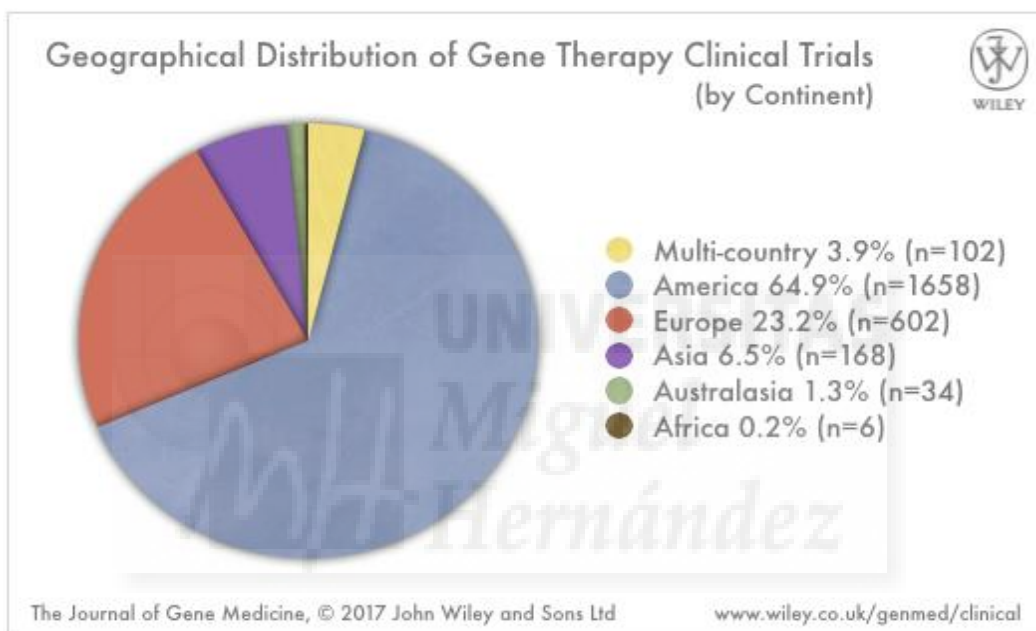


Figura 2. Distribución mundial de los protocolos sobre terapia génica.

En la actualidad existen varios productos de terapia génica en el mercado. Se puede destacar el primer protocolo aprobado a nivel mundial que fue el Gendicine® y el Glybera® que como se ha dicho anteriormente es el primero producto que se aprobó en Europa.

El **Gendicine®** se trata de un adenovirus oncolítico para el tratamiento del cáncer. Este tipo afecta a las células escamosas que revisten las superficies húmedas y las mucosas dentro de la cabeza y el cuello, es decir, en el interior de la boca, la nariz y la garganta. Con este tratamiento las posibilidades de supervivencia aumentan un 10% a los 3 años. Se piensa que

este tratamiento podría aplicarse a diversos tumores que son inalcanzables con cirugía por su ubicación. <sup>(12)</sup>

El **Glybera®** es un Tratamiento que contiene virus adenosasociados que están modificados genéticamente y contienen copias de un gen que sintetiza la lipoproteína lipasa (LPL). Esta corrige la deficiencia de la lipoprolipasa, esta deficiencia es una de las enfermedades llamadas raras. Causa una hipertrigliceridemia, pancreatitis y hepatoesplenomegalia ya que la deficiencia de esta proteína tienen como consecuencia la no metabolización de los triglicéridos. <sup>(13)</sup>

El **Luxturna®** que es el último tratamiento de terapia génica que se ha lanzado al mercado para curar la ceguera producida por la mutación del gen RPE65 que causa una distrofia retiniana. Este tratamiento utiliza un virus adenoasociado, modificado genéticamente, para introducir el gen RPE65 mediante técnicas de ADN recombinantes. <sup>(14)</sup>

### 2.1.3 Tipos de patologías en las que se puede utilizar esta terapia.

Como se ha detallado anteriormente la terapia génica es una manipulación genética del organismo, con lo cual se podría utilizar en todas las enfermedades que son a causa de una modificación a nivel genético. Estas pueden ser heredadas como las monogénicas, enfermedades con herencia multifactorial (no solo el gen es el causante si no también el ambiente), de tipo adquirido como el SIDA..., enfermedades neurológicas degenerativas como el Parkinson o el Alzheimer y también en regeneraciones tisulares.

Existen varios factores que limitan el uso de esta terapia. Estos son los siguientes:

1. El primero tiene que ver con el tipo de herencia. Las enfermedades monogénicas, es decir, las de herencia mendeliana son más favorables para utilizar esta terapia, al contrario de las multifactoriales.

2. El segundo factor es el patrón de herencia. Las enfermedades con carácter recesivo son preferibles candidatas a las de carácter dominante, ya que su técnica es más fácil.

3. El tercer factor alude a la naturaleza de la enfermedad. Si es por pérdida de función, el gen dañado no produce la proteína necesaria. O si es por disfunción del gen, es decir, este produce una proteína mutante o dañina.

4. El cuarto factor es si existe la necesidad de un control en la expresión génica. Si la producción de la proteína no debe ser controlada, es mucho más fácil tratarla, que si necesitamos controlar el nivel exacto de proteína para que haya un funcionamiento normal.

5. El quinto factor es el tamaño de material genético que haya que reparar, si es un tamaño pequeño será más fácil encontrar un vector apropiado.

La patología donde se desarrollan más protocolos de terapia génica, con diferencia, es en diversos tipos de cáncer. Le siguen protocolos en enfermedades monogénicas e infecciosas como el VIH.<sup>(15)</sup>

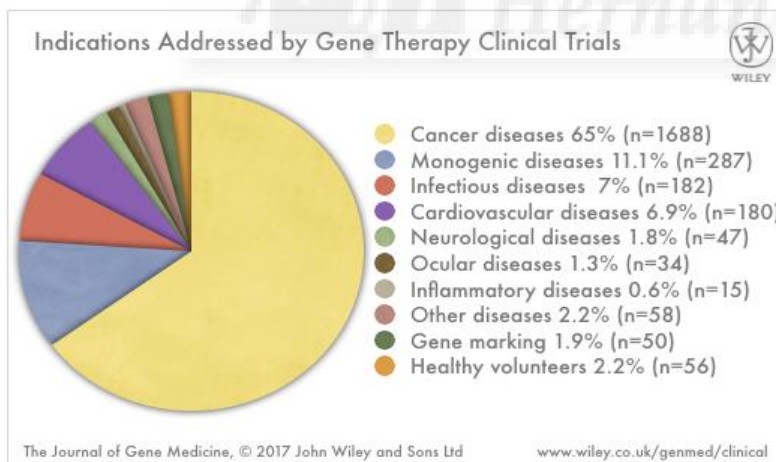


Figura 3. Proporción de las diferentes patologías sobre las que se está investigando o aplicando un protocolo en el campo de terapia génica.

## 2.2 Terapia génica en España.

En la actualidad España ha desarrollado 32 protocolos de terapia génica, un 1.2% del porcentaje mundial total. De estos 32 protocolos 6 han sido ya

cerrados y 26 siguen abiertos. Casi todos ellos se encuentran en fase I aunque hay algunos que ya están en fase II. España aparte de realizar protocolos individualmente también los realiza en colaboración con otros países. <sup>(16)</sup>

### 2.2.1 Caso de terapia en la Comunidad Valenciana

De esos 32 protocolos de terapia génicas citados anteriormente hay algunos que se han realizado en la C. Valenciana.

Los ensayos clínicos sobre terapia génica en la C.Valenciana se podrían remontar unos 10 años atrás y uno de los ensayos más importantes es el que el Hospital de la Fe en colaboración con otros hospitales de diferentes países realizó un estudio para tratar la Distrofia de Duchenne con terapia génica, esta afecta a más de 3000 niños en España. El ensayo obtuvo unos resultados positivos y a día de hoy se sigue con estudios diversos para llegar al tratamiento final con este tipo de terapia. <sup>(17)</sup>

*“Vamos a administrar un fármaco (PCT-124) partiendo de la hipótesis de que podría sellar este defecto genético, permitiendo que el propio organismo continúe su proceso de fabricación normal y pueda producir la distrofina”* ha indicado el dr. J.Jesús Vílchez, jefe de Servicio de Neurología del Hospital U. La Fe. <sup>(18)</sup>

Otro caso reciente de terapia génica en la Comunitat Valenciana es el propuesto por el Doctor Luis Sendra que pertenece al grupo de investigación en Farmacogenética del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, utilizando la terapia génica en el déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT), esta proteína interviene en la protección pulmonar y si no se produce puede derivar en daños como enfisema pulmonar, esta patología, que es una enfermedad rara de herencia monogénica, afecta al 0.22% de la población en España.

*“La transferencia génica hidrodinámica podría mediar la implementación del gen AAT, para mejorar el daño pulmonar aumentando la concentración plasmática de proteína normal, o reparación del gen con interés clínico en el tratamiento del DAAT.*

*“El siguiente paso será evaluar la posibilidad de mediar mutaciones de inserción o delección y la reparación de mutaciones específicas en lugar específico frecuentes en el DAAR mediante el sistema CRISPR/Cas9 en hígado humano”<sup>(19)</sup>*

## **2.3 Vectores de tipo viral.**

Los virus son agentes infecciosos microscópicos cuyos genomas están formados por ADN o ARN, pero no por ambos. Son metabólicamente dependientes ya que necesitan una célula donde hospedarse para poder replicarse. Por esta razón no se consideran estructuras biológicas vivas. Se caracterizan por la falta de estructura celular, ya que solo están formados por el material genético y una envoltura proteica que lo protege, llamada cápside, y en algunas ocasiones una envoltura lipídica que lo protege cuando está en el exterior de las células.

El material genético del virus se puede modificar para poder producir las proteínas que el organismo necesita y así infectar el organismo con este virus genéticamente modificado, podrían llegarse a tratar miles de enfermedades. Hoy en día sabemos que los virus son un tipo de vector ideal para la investigación en la terapia génica ya que es un vehículo de transfección muy eficaz.

### **2.3.1 Tipos de virus en la terapia génica.**

Hay muchos tipos de virus, pero los que actualmente se utilizan en terapia génica son los siguientes:

-Los **retrovirus** son un tipo de virus que contiene una cadena sencilla de ARN como material genético. La ventaja de estos virus es que la expresión en las células hospedadoras se prolonga durante mucho tiempo ya que se expresan en el genoma del organismo, pero esto a la vez también puede ocasionar problemas ya que puede adherirse a oncogenes. Dentro de los retrovirus nos encontramos con los **lentivirus**. Estos son diploides, es decir,



tiene dos cadenas de ARN y su transcripción inversa se realiza de la misma manera que en los retrovirus con la transcriptasa inversa. Infectan tanto a las células que se dividen como a las que no se dividen, es decir, se pueden usar en cualquier tipo de células del organismo. Puede permanecer hasta 6 meses modificando la expresión de la célula. Uno de los lentivirus más efectivos es el VIH. <sup>(20)</sup>

-Los **adenovirus** al contrario que los anteriores sí están compuesto por ADN lineal de cadena doble. Son virus muy estables frente a agentes físicos o químicos. En comparación con los anteriores son más grandes y complejos esto los aventaja ya que pueden insertar una cantidad mayor de material genético. Estos virus no se integran en el genoma del organismo con lo cual no pueden producir mutagénesis. <sup>(21)</sup>

-Los Virus **adeno-asociados** con ADN lineal de cadena sencilla tienen una peculiaridad y es que no son autónomos, es decir, infectan a las mismas células que están infectando los adenovirus o herpesvirus si no, no se pueden dividir. Si no infectan a una célula que este siendo infectada por uno de estos dos tipos de virus, directamente el material genético del adeno-asociado pasa a ser parte del genoma de la célula huésped. Son virus pequeños, con lo cual la cantidad de material genético que puede transferir es más pequeña que los anteriores, pero como ventaja puede infectar a cualquier célula de nuestro cuerpo.

-Los **herpesvirus** contienen en su material genético una doble cadena lineal de ADN. Es un tipo de virus muy grande con lo cual puede introducir una gran cantidad de material genético dentro del genoma de la célula huésped. Al estar dentro del genoma perdura un prolongado período de tiempo. Los herpesvirus pueden infectar a cualquier tipo de célula pero la problemática que tienen es que pueden producir alteraciones linfoproliferativas, con lo cual se necesitaría encontrar los genes que la producen y eliminarlos, dejando así solo los que son necesarios para la replicación y el mantenimiento del plásmido viral. Este tipo de virus no es muy empleado en la actualidad ya que no se sabe mucho de él en comparación con los anteriores. <sup>(22)</sup>



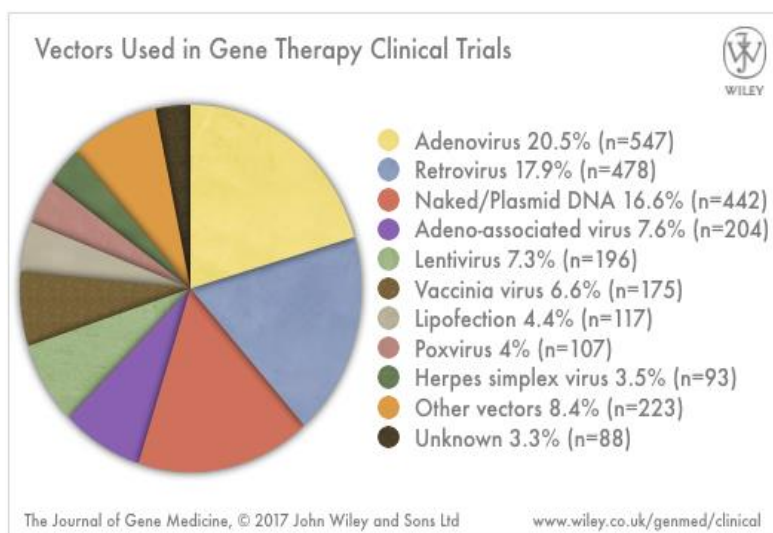


Figura 4. Porcentajes de los vectores utilizados para la transfección en terapia génica.

### 2.3.2 Lentivirus objeto de estudio de este trabajo de fin de grado.

El lentivirus utilizado en este trabajo experimental es el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) inocuo. Este virus como se ha comentado antes es uno de los más usados en el campo de terapia génica debido a sus cualidades.

El lentivirus que se usó se produjo en un laboratorio de Nápoles y es un virus genéticamente modificado, este virus codifica al menos unas 15 proteínas que están involucradas en la infección, tanto estructuralmente como en el proceso regulatorio de la misma. Con lo cual se eliminaron todos los genes que no eran necesarios para la infección, producción y/o integración del virus dejándole así inocuo. A parte de toda esta modificación genética, a este virus se le introdujo el gen que codifica la green fluorescent protein (GFP), para luego poder infectar a las células del experimento y que estas expresasen la proteína. Que es una proteína fluorescente que normalmente se usa en el campo de la biología para marcar células. <sup>(23)</sup>

Una de las peculiaridades del lentivirus utilizado, es que el gen que expresa la GFP viene precedido de una secuencia llamada TRE (tet responsive element) esta es sensible a un transactivador, el cual se une y produce la transcripción del gen. En este caso esta secuencia es sensible al rTa (reverse tetracycline-controlled transactivator) que es un regulador transcripcional. Este

regulador por sí solo reprime la transcripción ya que no está unida a la TRE, necesita un activador que en este caso es la tetraciclina. Al unirse a la tetraciclina produce un cambio conformacional y de esta manera puede unirse a la TRE. Esto hace que se produzca la transcripción correctamente y con ello una expresión adecuada de la GFP. (24) (25)

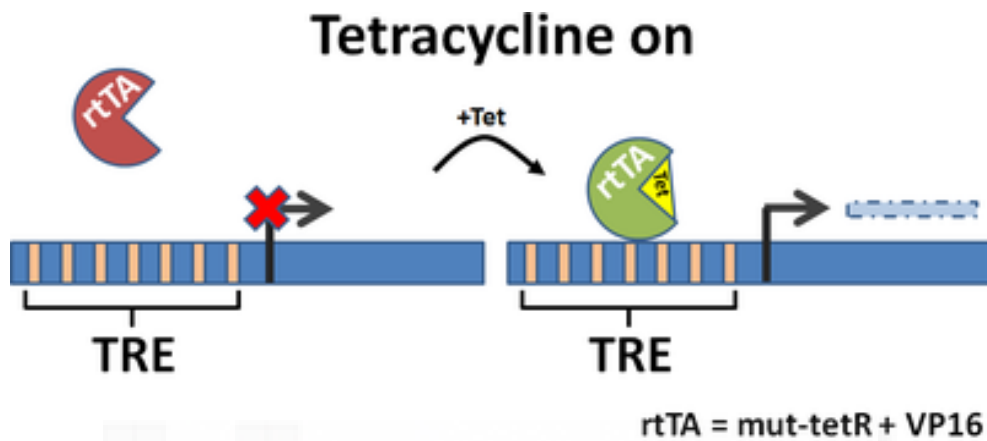


Figura 5. Modelo de la activación a partir de tetraciclina del transactivador. (26)

### 3. OBJETIVOS.

Estudiar la eficiencia de la infección y transmisión de GFP a través de un vector lentiviral de VIH-1 atenuado en células embrionarias de riñón humano (HEK 293).

### 4. METODOLOGÍA.

#### 4.1 Línea celular objeto del material de este trabajo.

Para este estudio hemos elegido la línea celular embrionaria humana de riñón (HEK 293). La línea Hek293 son células fácilmente cultivables y transfectables, con un tamaño de unas 13 micras, por lo que son muy útiles en experimentación ya que pueden producir proteínas exógenas y sirven como modelos para investigar cascadas de señalización, entre otras funciones. Las Hek293 tienen propiedades tanto endoteliales, epiteliales y de fibroblastos, relacionadas con su naturaleza de riñón embrionario, como neurales.

##### 4.1.1 Material.

- Cabina de seguridad biológica Clase II. (Figura 4)
- Células HEK 293.
- Centrifuga.
- Etanol 70%.
- Frasco de cultivo de plástico de 25 cm<sup>2</sup>.
- Mircropipetas 20µl, 200µly 1000µl.
- Pipetas 10ml y 5ml.
- Propipeta.
- Puntas.
- Tubo Falcon de 50ml.
- Medio de Cultivo:
  - 86% de medio Dulbecco (DMEM).
  - 10% Suero fetal bovino (SBF).
  - 1% Antibiótico Penicilina y estreptomicina.
  - 1% Glutamina.
  - 1% Aminoácidos no esenciales.

#### 4.1.2. Protocolo

Las HEK293 se conservan en críotubos estos se mantienen en depósitos de nitrógeno líquido. Los críotubos se extraen y se meten rápidamente en un baño a 37°C, a la vez que se agita suavemente, siempre manteniendo el tapón del críotubo fuera del agua para disminuir la posible contaminación. Antes de su congelación total, se lleva la cabina.

Antes de introducirlo en la cabina, esta debe estar esterilizada dejando los rayos ultravioletas previamente 5 minutos y limpiándola con etanol al 70%, no solo se debe limpiar la cabina si no también todos los productos que se vayan a introducir en ella, pulverizándolos con un poco de etanol (70%) y dejándolos unos minutos dentro de la cabina para descontaminarlos.

Las líneas celulares que están en el críotubo se pasan a un tubo Falcon y se introducen de 9 a 10 ml de medio de cultivo DMEM para poder centrifugarlo a 1000 rpm durante 5 minutos.

Una vez haya acabado la centrifuga, se debe retirar el sobrenadante con ayuda de la bomba de vacío, y se diluirán las células con 1 ml de medio de cultivo DMEM. A continuación, se traspasan las células a un frasco de cultivo de 25ml y se añaden con 4 ml de medio de cultivo DMEM. Finalmente se nombra el frasco con las líneas y se mantiene en la estufa durante 24 horas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente, se quita el medio de cultivo con la bomba de vacío, donde sobrenadarán las células muertas, y se añaden 4 ml de medio nuevo.

El medio de cultivo se cambia cada 3 o 4 días. Par realizars este cambio se retirar el medio antiguo, mediante la bomba de vacío, y se añaden 4 ml de medio nuevo en el frasco de cultivo.

Para el estudio cinético de la línea celular HEK 293 se cultivaron las células en placas de 12 pocillos de plástico.



Figura 6. Sala de cultivos celulares del Instituto Neurociencias. Al fondo se sitúan las dos campanas de seguridad biológica de clase II. Y a la derecha se

## 4.2 Preparación de cultivos celulares en cubreobjetos.

### 4.2.1 Material

- Agua esteril.
- Cámara de Neubauer.
- Campana de seguridad biológica Clase II.
- Colorante para el conteo.
- Cubres.
- Eppendorf.
- Falcon de 50ml.
- Gradilla.
- Medio de Cultivo.
- Micropipetas de 20  $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000  $\mu$ l.
- Pinzas.
- Pipetas.
- Propipeta.
- Puntas.
- Placas de cultivo celular de 12 pocillos.

### 4.2.2. Protocolo.

#### 4.2.2.1 Fijación de los cubres en las placas.

Primeramente se esteriliza la campana como en los anteriores procesos, ya que se va a trabajar en el interior de esta. Se vierte una gota de agua destilada en cada pocillo y se coloca meticulosamente un cubre encima de la gota. Cuando se han preparado todos los pocillos se vierten 100  $\mu$ l de poli-L-lisina encima del cubre en forma de gota intentado que no rebose fuera.

A continuación se mete en la estufa de 30 a 45 minutos a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2.2 Extracción de las células.

Volvemos a la campana después de haber pasado los 30-45 min y con una pipeta se extraen de los frascos, que habíamos guardado dentro de la estufa, las células que se estaban cultivando y se introducen en un tubo Falcon de 50ml. Como en los frascos se quedan las células adheridas en las paredes se añaden 4 ml de tripsina para poder arrastrar todas están y se dejan alrededor de 5 min en la estufa. Una vez han pasado estos 5 min, se dan unos toques en las paredes de las botellas y se recoge el líquido con una pipeta para poder añadirlo a todas al tubo Falcon donde habíamos añadido las anteriores.

El tubo Falcon con las células se introduce en la centrifugadora para poderlo centrifugar a 1000rpm con una temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de haber terminado la centrifuga se absorbe el sobrenadante mediante una bomba de vacío y el pellet que ha quedado se disuelve en un medio específico.

#### 4.2.2.3 Conteo de células.

Con una micropipeta se cogen 50 µl del medio del tubo Falcon y se disuelven en 10 µl de colorante, en este caso, Azul Triptán, dentro de un Eppendorf. Esta disolución se depositará en la cámara Neubauer y se mirara en el microscopio.

La fórmula de conteo en cámara de Neubauer es:

$$N^{\circ} \text{ células} = n^{\circ} \text{ células por cuadro} \times \text{factor de conteo} \times \text{concentración} \times \text{volumen de disolución}$$

Y con esta fórmula se calcula el volumen necesario para tener alrededor de 50000 células.

#### 4.2.2.4 Preparación de los cubreobjetos.

Se retiran las placas que se habían dejado en la estufa y se vuelve a trabajar en la campana de seguridad. Se quita la poli-L-lisina de encima de los cubres con la ayuda de una bomba de vacío. Después de esto se hacen 3 lavados con 100 µl de agua en cada pocillo. Una vez se han limpiado y secado con la bomba de vacío, se pone en cada cubreobjeto el volumen necesario con 50000 células, que se ha podido calcular gracias a la cámara de Neubauer y 75 µl de medio.

Se deja incubar en la estufa 24 h a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>

### 4.3 **Transfección del virus.**

Al tratarse de una manipulación con virus, que son biológicamente peligrosos, todo el proceso se realiza en una sala diferente a donde se realizan los anteriores procesos ya que las campanas podrían quedar contaminadas con este tipo de patógeno. Y todos los materiales usados deben ser desechados a un contenedor especial, o si no son desechables deben desinfectarse independientemente de los demás materiales.

#### 4.3.1 Material

- Campana de seguridad biológica
- Agua estéril
- Tampón fosfato salino (PBS)
- Medio de cultivo DMED
- Micropipetas
- Puntas
- Propipeta
- Pipeta
- Falcon 50ml
- Eppendorf.
- Gradilla.
- Filtros.
- Virus: lentivirus genéticamente modificado para la expresión de GFP.
- Activador: rTta (tetracycline-controlled transactivator)
- Antibiótico: Tetraciclina

#### 4.3.2 Protocolo

##### 4.3.2.1 Transfección del virus

Primeramente se enciende la campana y se utilizan los rayos UV para esterilizarla correctamente, cuando han pasado unos minutos se vuelve a esterilizar pulverizando etanol y todos los objetos que se introducen dentro de ella también.

Una vez se ha esterilizado, se comienza con las diluciones que se necesitan para hacer la transfección. Primero se filtran 50ml de PBS en un Falcon mediante un disco de filtro para que no haya ningún tipo de impureza. Luego se saca del congelador la alícuota que contiene el virus genéticamente modificado, este no lo hemos modificado nosotros, si no que procede de un laboratorio italiano. La alícuota se introduce en un baño María durante unos segundos para llevarlo hasta temperatura ambiente. Una vez esta listo para ser manipulado, se procede a hacer las diluciones en PBS.

Las diluciones que se van a utilizar en este experimento son de 1:100, 1:50, 1:20 y 1:5. Con lo cual se diluirán 1µl del virus en 100µl del PBS filtrado y así con todas las demás concentraciones. Estas se deberán almacenar en un Eppendorf etiquetado correctamente.

También se debe realizar la dilución del activador (rTta), la concentración de este es de 1µl en 40ml de PBS filtrado. Al igual que las anteriores también se realizará en un Eppendorf nombrado correctamente

Cuando ya se tienen todas las diluciones preparadas, se coge la placa con las células que estaban listas con los cubreobjetos y se añade a cada pocillo 500µl de MED y después de esto 2µl del rTta y seguidamente 2µl del lentivirus.

Se deja incubar en la estufa 24 h a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>

##### 4.3.2.2 Introducción del antibiótico

Una vez hayan pasado las 24h se coge la placa se vuelve a meter en la campana, previamente esterilizada, y se cambia el medio. Este medio se



elabora diluyendo en un Falcon 4µl de Tetraciclina en 10ml de PBS. Cuando tengamos la dilución preparada, se absorbe mediante una bomba de vacío el medio antiguo y se le añade 1ml de MED nuevo.

Se deja incubar en la estufa 24 h a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>. Y gracias a la adición del antibiótico a las 24h debería verse bajo el microscopio con luz ultravioleta la expresión de la GFP en las células.

Estos dos procesos se deben realizar con la menor luz posible ya que la proteína que estamos transfectando es una proteína fotosensible y si se expusiese mucho a la luz podría afectar al resultado del experimento.

#### **4.4 Inmunofluorescencia.**

En este experimento hemos utilizado una inmunofluorescencia secundaria o indirecta, es decir, en la cual se requieren dos anticuerpos, el primario y el secundario. El primario se une a una proteína de la célula diana en este caso α-GFP y el secundario que es el que está marcado con el fluoróforo se une al primario. Este procedimiento dejara marcado todos los núcleos que contenga la proteína GFP. La razón de uso de esta metodología es la amplificación de la señal GFP en las células debidas a la infección del lentivirus.

##### **4.4.1. Material.**

- Agitador orbital.
- Papel de aluminio.
- Tampón fosfato salino (PBS) 1x.
- Micropipetas de 20µl, 200µl, 1000µl.
- Puntas.
- Paraformaldehído al 4%.
- Pipeta de Pasteur.
- Mowiol-NPG o Glicerol
- Portas de vidrio.
- Microscopio confocal.
- Suero de caballo o "Horse serum". (Solución bloqueo)
- DAKO.
- Anticuerpo primario: α-GFP in chicken al 1:500 en DAKO con 1% de "Horse serum".

- Anticuerpo secundario:  
Alexa Green 488 anti-chicken  
al 1:500 en PBS 1x.
- 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-  
carboxamida (DAPI) al  
1:500 en PBS.

#### 4.4.2. Protocolo

##### 4.4.2.1. Marcado del anticuerpo primario.

Mediante la bomba de vacío se absorbe el medio de cultivo de los cubreobjetos que hay en los pocillos y las células se fijan con 1 ml de paraformaldehído al 4% a los cubres y se dejan en el agitador orbital durante 10 min.

Los pocillos se lavan con PBS 1x, y se deja en el agitador orbital durante 10 min también para que se limpien correctamente. Este proceso se hace tres veces. Una vez realizadas los tres lavados se extrae el PBS y se agregan 700  $\mu$ l a cada pocillo de una disolución al 10% de "Horse Serum" en PBS y se deja en el agitador orbital durante 1 hora. El "Horse Serum" es la solución bloqueo esta sirve para bloquear algunas proteínas y así prevenir uniones no específicas del anticuerpo primario y evitar falsos positivos. Esto hace que el anticuerpo primario sea más específico para la  $\alpha$ GFP.

Por otro parte, se preparará la disolución de anticuerpo primario 1:500 en PBS 1x, de esta se necesitan 700 $\mu$ l por pocillo. Con lo cual, una vez pasada la hora de agitación con la solución bloqueo se retira esta misma y se añade los 700 $\mu$ l de la disolución de anticuerpo primario.

Estas placas se conservan en agitación a 4°C durante 24 horas.

##### 4.4.2.2 Marcador de anticuerpo secundario.

Una vez han pasado las 24 h se efectúa un lavado de PBS con un 1% de solución bloqueo durante 10 minutos en el agitador orbital. Este procedimiento se realiza tres veces. Al mismo tiempo se realizan las disoluciones del anticuerpo secundario que constarán de anticuerpos con fluorescencia verde contra anticuerpos de pollo en dilución 1:500 en PBS.

Se añade a todos los pocillos 700µl y durante 2 horas se dejan en el agitador orbital. Al contener el anticuerpo secundario que es fotosensible y se puede oxidar y perder la capacidad fluorescencia, las placas se envuelven en papel de aluminio para preservarlo de este peligro. Una vez han pasado las 2 horas se vuelven a realizar los lavados de PBS también de 10 minutos cada uno y por triplicado.

Se prepara 10µl de DAPI en 10ml de PBS y se añaden 700µl de esta disolución a cada pocillo, se deja 10 minutos en agitación envueltas de papel de aluminio. Para finalizar se realizarán tres lavados de PBS durante 10 minutos en agitación como hemos hecho siempre a lo largo de este proceso Esta solución marcará todos los núcleos de las células, contengan o no la proteína GFP.

#### 4.4.2.3. Montaje de portas.

Se pone una gota de Mowiol-NPG, o glicerol, en el portaobjeto y se colocará lentamente un cubreobjetos, con la cara donde se encuentran las células hacia abajo, con la ayuda de unas pinzas. Es muy importante que no se formen burbujas para luego poder observar bien la muestra en el confocal. Este proceso hay que realizarlo donde menos luz haya por la fotosensibilidad que tienen las muestras.

Los portaobjetos deben ser rotulados con el tipo celular, nombre de la persona responsable y fecha.

### **4.5 Microscopía confocal.**

Todas las muestras se observaron bajo microscopia confocal (Leica SPEII) utilizando “stacks” de imágenes digitales.

Las imágenes que se tomaron fueron con el objetivo de 1x63. Según la imagen que queríamos tomar debíamos cambiar la secuencia del confocal ya que las imágenes se perciben a diferente longitud de onda. Esto quiere decir que si queríamos ver el marcaje de los núcleos de la célula gracias al DAPI

debíamos poner una secuencia de 405nm porque eran de color azul y si queríamos ver la proteína GFP que era ver debíamos poner la secuencia a 488nm.

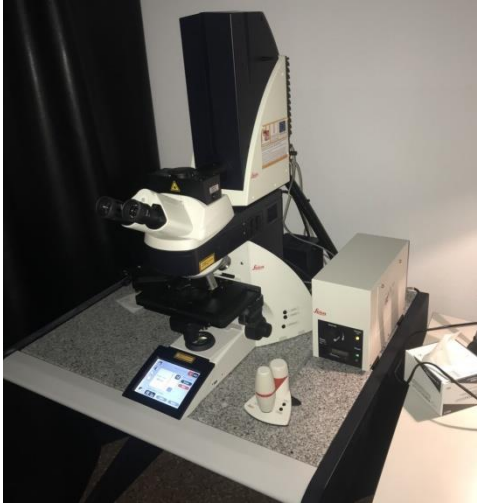


Figura 7. Microscopio Leica confocal SPE-2 en

#### 4.6 Contaje de células infectadas.

Para realizar el contaje de células infectadas, se escogió aleatoriamente 5 regiones de una misma preparación. Y se contó manualmente célula a célula con la ayuda del programa Paint, dibujando unas celdas para así facilitar el contaje.

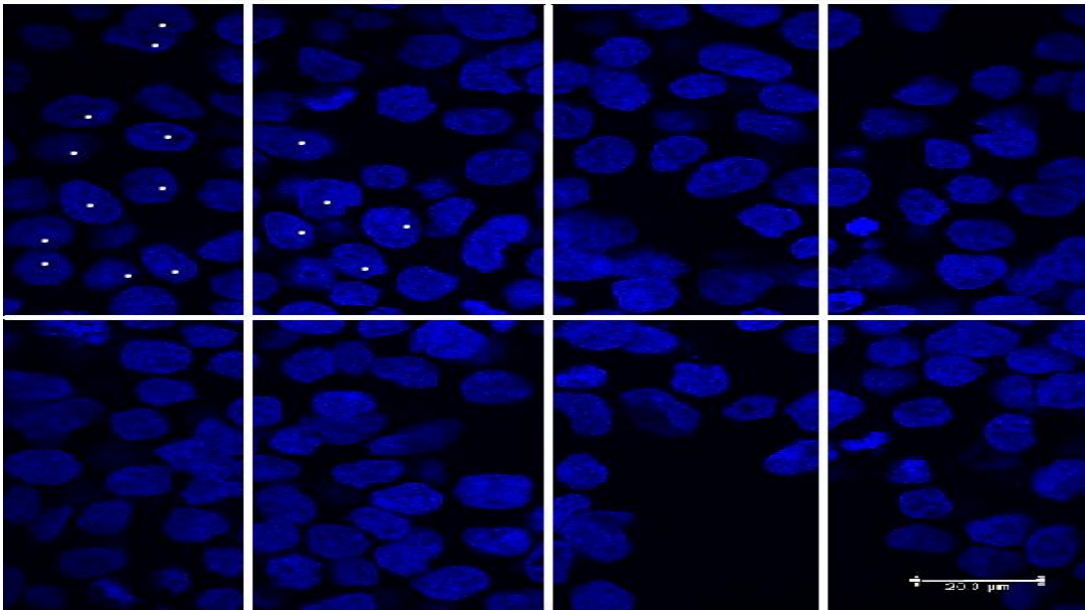


Figura 8. Demostración del contaje celular.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo de fin de grado de carácter experimental, se ha trabajado con una línea celular a la que se le ha transfectado un lentivirus a diferentes concentraciones, este virus ha sido modificado genéticamente. Nuestro objetivo ha sido determinar cualitativamente y semi-cuantitativamente el número de células que habían sido infectadas.

Para el experimento utilizamos una línea estándar de HEK 293, ya que tienen una gran facilidad para cultivarse y son una de las líneas que más se utiliza para transfectar genes.

El virus utilizado fue un lentivirus, en concreto el VIH-1 modificado genéticamente para que porte en su material genético el gen que produce la proteína GFP que es una proteína fluorescente que se utiliza como marcador biológico. Gracias a este marcador se pueden observar las células que han sido infectadas porque el núcleo de la célula se ve fluorescente. Y con esto ver que concentración de virus es la idónea para infectar al mayor número de células posibles.

El trabajo con el lentivirus modificado genéticamente, ha sido muy seguro. El mero hecho de poder inocular el virus a expensas de añadir el transactivador (rTta) hace que el riesgo de infección sea mínimo. Además de poder controlar la capacidad de activar, mediante tetraciclina, la expresión de un gen determinado hace que sea una técnica muy poderosa para el laboratorio.

Este lentivirus no lo modificamos nosotros si no que nos lo enviaron desde un laboratorio de Nápoles donde también se había realizado este experimento, con lo cual partíamos de un protocolo, en este protocolo aparecía que la concentración idónea para que se infectasen el mayor número de células era de 1:20. Quisimos contrastar estos datos y por ello trabajamos con diferentes concentraciones, estas fueron, 1:100, 1:50, 1:20, 1:5.

## 5.1 Inmunocitología con fluorescencia.

Aunque a simple vista podíamos observar las células verdes bajo fluorescencia, decidimos realizar un marcaje de las mismas con inmunocitoquímicas para amplificar la señal y poder contar más cómodamente los campos fotografiados del confocal.

Normalmente, cuando se hace una inmunocitología se debe hacer un experimento control, esto quiere decir que en la inmunofluorescencia se sustituye la disolución de anticuerpo primario por PBS en un pocillo, en cambio el anticuerpo secundario se añade en todos los pocillos. Esto sirve para ver la especificidad del anticuerpo primario y el fondo que se puede formar en la cadena de anticuerpos secundarios. Para poder demostrar esto hay que hacer una inmunofluorescencia sin añadir el anticuerpo primario.

En este experimento el control se realizó el control en material no infectado pero no se pudo realizar en células infectadas ya que la cantidad de alícuota del virus que nos llegó desde Italia era muy pequeña y no había suficiente material para hacerlo. Los resultados de la especificidad del anticuerpo sobre las HEK293 fueron perfectos ya que en el portaobjetos y bajo fluorescencia no pudimos advertir ninguna señal de emisión de la luz verde (488nm). Entre todos consensuamos que era mejor usar esta valiosa materia para tener varias muestras de las distintas concentraciones y poder compararlas entre ellas que hacer una muestra control ya que la inmunocitología no debería de fallar.



### 5.1.1 Concentración 1:100

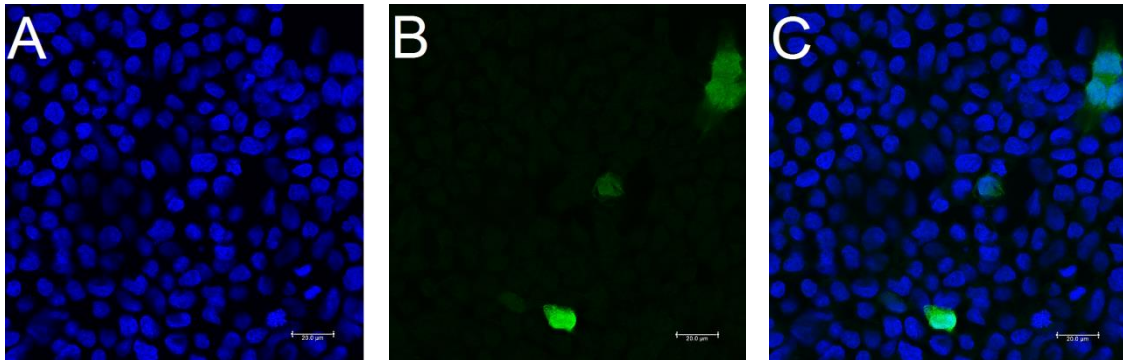


Figura 7. Marcaje en células HEK293 infectadas con la concentración 1:100 del lentivirus. **A)** Tinción de DAPI para la observación de núcleos. **B)** expresión de HEK293 infectadas. **C)** Composición de A y B juntas. Objetivo utilizado 63x en un microscopio Leica confocal SPE-2.

### 5.1.2 Concentración 1:50

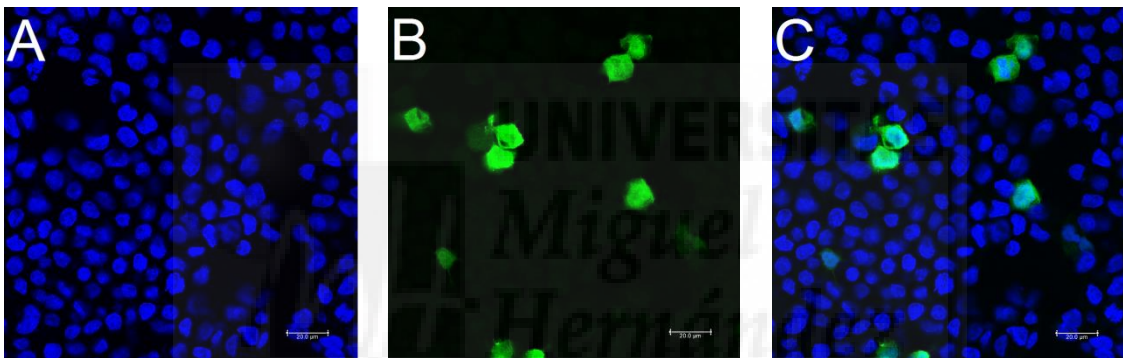


Figura 8. Marcaje en células HEK293 infectadas con la concentración 1:50 del lentivirus. **A)** Tinción de DAPI para la observación de núcleos. **B)** expresión de HEK293 infectadas. **C)** Composición de A y B juntas. Objetivo utilizado 63x en un microscopio Leica confocal SPE-2.

### 5.1.3 Concentración 1:20

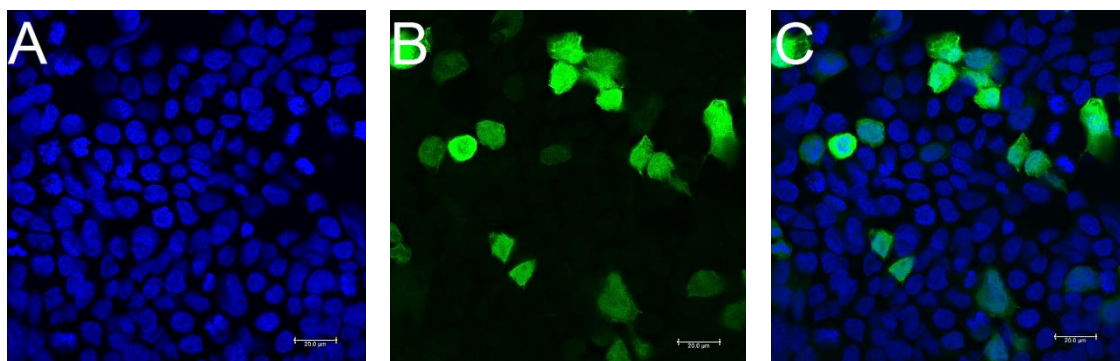


Figura 9. Marcaje en células HEK293 infectadas con la concentración 1:20 del lentivirus. **A)** Tinción de DAPI para la observación de núcleos. **B)** expresión de HEK293 infectadas. **C)** Composición de A y B juntas. Objetivo utilizado 63x en un microscopio Leica confocal SPE-2.

#### 5.1.4 Concentración 1:5

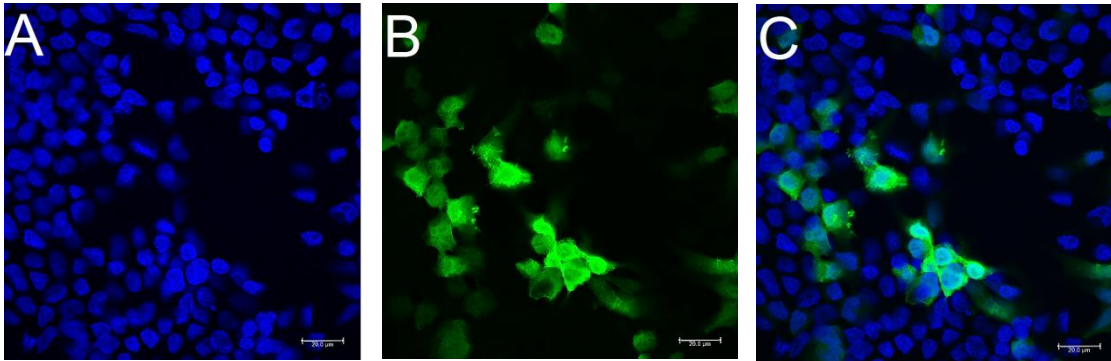
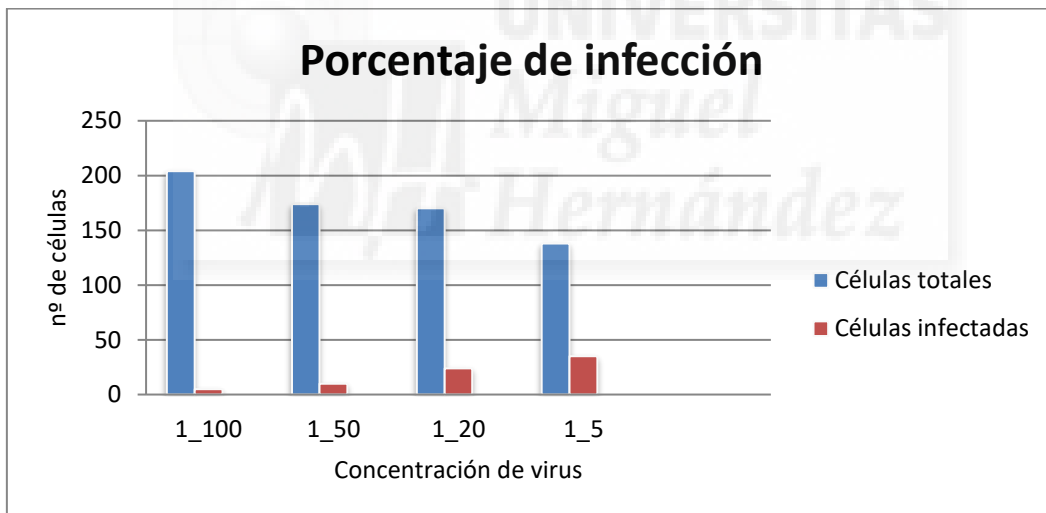


Figura 10. Marcaje en células HEK293 infectadas concentración 1:5 del lentivirus. **A)** Tinción de DAPI para la observación de núcleos. **B)** expresión de HEK293 infectadas. **C)** Composición de A y B juntas. Objetivo utilizado 63x en un microscopio Leica confocal SPE

#### Resultados totales



Grafica 1. Grafica de la infección de las células HEK293 con distintas concentraciones de lentivirus. Se observa que a mayor concentración mayor número de células infectadas.

Concentración	Células totales	Células infectadas	Porcentaje infectado
<b>1:100</b>	204	5	<b>2.45%</b>
<b>1:50</b>	174	10	<b>5.75%</b>
<b>1:20</b>	170	24	<b>14.11%</b>
<b>1:5</b>	138	35	<b>25.36%</b>

Tabla 1. Resultado de la transfección tanto cuantitativo como porcentual de todas las concentraciones con las que se ha experimentado.



Como se puede comprobar la concentración del vector con el que se infecta es directamente proporcional con las células infectadas, es decir, cuanto más virus tranfectábamos más células han expresado la GFP.

Según la literatura que he leído, describe que con la concentración 1:20 del vector viral deberíamos haber llegado a un 100% de células HEK293 infectadas. Sin embargo, como podemos ver en los resultados esto no ha sucedido. Es más, aunque seguíamos aumentando la concentración nunca llegamos al 100% de las células. Debido a la pequeña cantidad de material que nos habían cedido, no pudimos trabajar con diluciones más concentradas. Creo que siguiendo la tendencia de la gráfica en una situación de no dilución del lentivirus no podríamos llegar a una infección del 100%.

Esta diferencia de resultados pensamos que pudo ser debido a que el virus se envió desde Nápoles, ya que no sabemos cómo vinieron las alícuotas de virus desde allí y si hubo algún cambio de temperatura brusco en el viaje. Pensamos que tuvo que haber una o dos congelaciones de las alícuotas. Esto pudo variar las condiciones físico-químicas del virus que están íntimamente ligadas a la capacidad infecciosa de este. También observamos que en la replicación de los experimentos al cabo de dos semanas, el número de células infectadas fue menor aunque usamos las mismas concentraciones. Por lo que concluimos que cuanto más tiempo conservábamos el virus y más lo manipulábamos, congelándolo y descongelándolo para trabajar con el, menos capacidad de infección poseía.

## 6. CONCLUSIÓN

En este trabajo experimental hemos tratado el tema de la terapia génica, el modo de empleo y las aplicaciones que tiene esta. Hemos planteado si es una terapia del futuro válida en nuestro sistema de salud. Aunque he argumentado que ya es una realidad con varios casos existentes alrededor del mundo y cerca de nosotros, hemos querido estudiar en el laboratorio de investigación básica cómo de poderosa es esta terapia a partir de la infección llevada a cabo por virus. Hemos elegido la infección del lentivirus genéticamente modificado para producir GFP en las células embrionarias humanas de riñón (Línea HEK293). Esto nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

1. La transfección de la proteína GFP a las células HEK es viable, segura y directa en corto período de tiempo, ya que han observado varios núcleos de células con la expresión de la GFP.
2. Cuanto mayor sea la concentración de virus utilizada mayor será el número de células infectadas.
3. El tiempo y la calidad de conservación del virus es muy importante para su capacidad infecciosa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz Castellanos M., Sangro B.. Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve?. Anales Sis San Navarra [Internet]. 2005 Abr [citado 2018 Ene 26] ; 28( 1 ): 17-27.
2. Austin-Ward Enrique Daniel, Villaseca G Cecilia. La terapia génica y sus aplicaciones. Rev. méd. Chile [Internet]. 1998 Jul [citado 2018 Ene 26] ; 126( 7 ): 838-845.
3. Juan Ramón LACADENA, *Terapia génica*, 1999,.
4. Carlos Alonso BEDATE, “Terapia genética”, en Carlos María ROMEO CASABONA (Ed.), *Genética Humana. Fundamentos para el estudio de los efectos sociales de las investigaciones sobre el genoma humano*, Cátedra de Derecho y Genoma Humano, Fundación BBV-Diputación Foral de Bizkaia, Universidad de Deusto, Bilbao, 1995, pp. 260-261.
5. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 459:70-83.
6. Kaufmann K, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene Therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine*. 2013; 5:1642-1661.
7. Fuente: <http://www.fundacionmencia.org/es/enfermedades-geneticas/terapia-genica/>
8. David SUZUKI y Peter KNUDTSON, *Genética. Conflictos entre la ingeniería genética y los valores humanos*, Editorial Tecnos, S. A., Madrid, 1991, pp. 163-164.
9. Yin H, Kanasty R, Eltoukhy A, Vegas A, Dorkin J, Anderson D. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014; 15(8):541-555.
10. Sheri L Koshman, Joseph Blais. What is Pharmacy Research. *Can J Hosp Pharm*. 2011 Mar-Apr; 64(2): 154–155.

11. Agencia Española del Medicamento. 2016 [cited 30 May 2016]. Available from: [https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp\\_TA.htm](https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm)
12. Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther.* 2005 Sep;16(9):1014-5.
13. Miller N. Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 May;11(5):419.
14. Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha A Jr, Woo SJ, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Eye Res.* 2017.
15. Friedman and Roblin. Gene therapy for human genetic disease. *Science,* 1972; 175: 949-955.
16. Available from: Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, provide by the Journal of Gene Medicine.
17. La Fe estudia un nuevo tratamiento con terapia genética para la Distrofia de Duchenne Fuente: La generalitat Valenciana.
18. Available: <http://www.levante-emv.com/ciencia-salud/2008/06/02/fe-estudia-nuevo-tratamiento-terapia-genica-distrofia-duchenne/454870.html>
19. Available. <https://www.iislafe.es/es/actualidad/noticias/2898/luis-sendra-logra-el-premio-internacional-alta-por-su-trabajo-sobre-el-tratamiento-del-deficit-de-alfa-1-antitripsina>.
20. Legorreta Herrera M, Martínez Flores F, Hernández Sánchez F, Zentella Dehesa A. Los Vectores virales y la transgénesis. *Vertientes Revista especializada en Ciencias de la Salud.* 2012; 15(1):5-14.
21. Vorburger S. Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist.* 2002; 7(1):46-59-
22. Collins M Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2015; 282(1821):20143003

23. Tiscronia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 2006;1(1):241-5.
24. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *PNAS* . 1992 Jun 15;89(12):5547-51
25. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, & Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* . 1995 Jun 23;268(5218):1766-9.
26. Fuente: <https://www.addgene.org/tetracycline/>

