

Estrategias de transferencia génica en cerebro mediadas por vectores virales adenoasociados

José M. Brito Armas¹, Ibrahim González Marrero², Agustín Castañeyra Perdomo², Emilia Carmona Calero², Antonio Alayón Fumero³ Javier R. Castro Hernández² y Rafael Castro Fuentes*¹

1. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife. Spain.

2. Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife. Spain.

3. Centro Neurológico *Antonio Alayón*, S/C de Tenerife, Tenerife. Spain.

***Correspondencia:** Dr. Rafael Castro (jrcastro@ull.es)

Resumen

La expresión en el cerebro de genes administrados exógenamente se ha propuesto como terapia alternativa para una gran variedad de enfermedades hereditarias y adquiridas del SNC, para las que los tratamientos disponibles no proveen una recuperación plena o incluso pueden generar serios efectos colaterales. Durante los últimos años ha habido mucha investigación en terapia génica, con progresos significativos en el desarrollo de nuevas estrategias tanto virales como no virales de transferencia génica en el SNC, y en la evaluación de su potencial en el tratamiento de enfermedades neurológicas. En la pasada década la transferencia génica viral ha progresado desde ser meramente una aplicación en investigación animal hasta convertirse en una estrategia terapéutica experimental en humanos. Entre los diferentes sistemas virales desarrollados para este propósito, los vectores virales adenoasociados han sido uno de los más utilizados. El grado de expresión génica y la distribución en el cerebro van a depender de la estructura del vector, de los promotores empleados, y del sitio, volumen y tasa de inyección. Sin embargo, debido al impedimento de las medicinas génicas en cruzar la barrera hematoencefálica, se emplean rutas invasivas de administración y que producen una expresión génica localizada, a pesar de que el tratamiento de muchos desórdenes neurológicos requiere la transferencia del transgén a todo el SNC. En esta revisión trataremos las diferentes estrategias de transferencia génica, mediadas por vectores virales adenoasociados, que están desarrollándose con propósitos terapéuticos para enfermedades cerebrales.

Palabras clave

Transferencia génica, AAV9, cerebro, barrera hematoencefálica, enfermedades neurodegenerativas, vectores adenoasociados.

Summary

The expression in the brain of exogenously administered genes has been proposed as an alternative therapy for a large variety of hereditary and acquired diseases of the SNC, and in particular

for those whose available treatment does not offer complete recovery and can even have serious side effects. There has been much research into gene therapy recently, with significant progress having been made in the development of new techniques of not only viral but also non viral gene delivery in the SNC, and in the evaluation of its potential for treating neurodegenerative diseases. In the last ten years, viral gene transfer has progressed from merely being an application in animal research to becoming an experimental therapeutic technique in humans. Adeno-associated viral vectors have been one of the most widely used of the many different viral systems developed for this purpose. The degree of gene expression and its distribution in the brain are going to depend on the structure of the vector, on the promoters used, and on the site, volume and rate of injection. However, due to the difficulty which the gene medicines have in crossing the blood brain barrier, invasive administration routes are being used which produce a localized gene expression, despite the fact that many neurodegenerative disorders require transgene delivery to the whole of the SNC. This review looks at the different gene delivery techniques, via adeno-associated viral vectors, which are being developed with therapeutic aims for brain diseases.

Key words

Gene delivery, AAV9, brain, blood brain barrier, neurodegenerative diseases, adeno-associated vectors.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud las enfermedades cerebrales representan un 30% del total. Este elevado número se relaciona claramente con el hecho de que los fármacos actualmente disponibles para el SNC tratan sólo un porcentaje extremadamente pequeño de enfermedades cerebrales, dejando sin tratar importantes desórdenes, tales como, la enfermedad de Alzheimer, tumor cerebral, ictus, autismo, retraso mental congénito, y ataxia. La industria farmacéutica ha realizado ingentes esfuerzos en

desarrollar fármacos para el SNC, pero el número de fracasos ha ido desafortunadamente en paralelo con los miles de fármacos diseñados y ensayados.

La administración vía sanguínea tanto de fármacos como de genes a pacientes afectados por enfermedades multifocales confinadas al SNC puede resultar terapéuticamente inefectiva debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual forma una pared inaccesible a la mayoría de las moléculas. La BHE está constituida por una estructura endotelial especializada, formada por la interacción entre células endoteliales y numerosas prolongaciones de astrocitos que regulan el paso y difusión de moléculas desde la sangre al SNC [44]. Puede distinguirse del endotelio normal por la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales (que son impermeables a macromoléculas e incluso iones) y por unas reducidas actividades endocitóticas y pinocitóticas, las cuales disminuyen considerablemente el número de moléculas que pueden cruzar la BHE de manera no específica [106]. Por tanto, el SNC no es fácilmente accesible a la administración sistémica de macromoléculas con actividad terapéutica, tales como, factores de crecimiento, citoquinas o enzimas. Las moléculas pequeñas del orden de 400-500 Da y también algunas proteínas pequeñas solubles en lípidos pueden pasar a través de la BHE. Sin embargo, el transporte al SNC de casi todas las proteínas más grandes ocurre a través de transcitosis mediada por receptores. Entre los receptores bien caracterizados de la BHE se encuentran: el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), el receptor de transferrina y el receptor de factor de crecimiento insulínico (IGFR) [58]. Sólo la presencia de mecanismos de transporte específicos asegura que las moléculas esenciales para el metabolismo cerebral alcancen el parénquima cerebral.

La expresión en el cerebro de genes administrados exógenamente se ha propuesto como terapia alternativa para una gran variedad de enfermedades hereditarias y adquiridas del SNC [31,94] para las que la farmacoterapia clásica no es asequible o no resulta fácilmente aplicable. Aunque hay varias enfermedades del SNC que requieren de un tratamiento a largo plazo, en la mayoría de los casos, los enfoques terapéuticos disponibles no proveen una recuperación plena o incluso pueden generar serios efectos colaterales, al afectar a varios sistemas del SNC o periférico. La tecnología de transferencia génica consiste en la transferencia de ADN a células diana y la expresión de la proteína codificada para propósitos terapéuticos, protectores o experimentales [58,72,73]. La transferencia génica en el SNC se ha investigado como estrategia de protección contra lesiones neuronales y degeneración. Los mejores candidatos para terapia génica son los factores neurotróficos, las moléculas antioxidantes o antiapoptóticas, y diferentes

moléculas específicas de señalización celular, las cuales son de gran interés para neuroprotección en condiciones patológicas en las que hay formación de radicales libres (esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, isquemia cerebral, y otras) [64,89].

La elección de un vector apropiado que transfiera el gen deseado (transgén) en el área cerebral afectada es crucial a la hora de establecer una terapia génica segura y eficiente para el SNC. Durante los últimos años ha habido mucha investigación en terapia génica, con progresos significativos en el desarrollo de nuevas estrategias de transferencia génica en el SNC, y en la evaluación de su potencial en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Entre los diferentes sistemas desarrollados para este propósito, los vectores virales han sido sin duda los más empleados (Tabla). Sin embargo, debido al impedimento de las medicinas génicas en cruzar la BHE, la mayoría de los trabajos realizados han utilizado vectores virales adenoasociados o vectores lentivirales (mediante rutas invasivas de administración tales como la inyección intracerebral con craneotomía) (Fig. 1) y que, además, producen una expresión génica localizada [64]. Aunque la inyección directa intracerebral de vectores virales que expresan transgenes puede ser una alternativa razonable para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas localizadas, en las que están implicadas estructuras anatómicas discretas del cerebro [84], el tratamiento de muchos desórdenes neurológicos requiere la transferencia del transgén a todo el SNC. Por otro lado, el pequeño tamaño del ratón favorece una expresión génica más distribuida, necesitándose apenas cinco inyecciones de vector en todo el cerebro. Sin embargo, el mayor tamaño del cerebro humano haría necesarias demasiadas inyecciones locales, siendo ello clínicamente impracticable.

En esta revisión trataremos las diferentes estrategias de transferencia génica, mediadas por vectores virales adenoasociados, que están desarrollándose con propósitos terapéuticos para enfermedades cerebrales.

CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS ADENOASOCIADOS

Los virus adenoasociados (AAV) son miembros humanos de la familia de parvovirus. Son virus de forma icosaédrica y sin envuelta. Las partículas del virus son muy estables al calor y resistentes a una variedad de compuestos, tales como cloroformo y etanol. Su genoma está formado por un ADN monocatenario de aproximadamente 5Kb. AAV es un dependo virus, lo que significa que el virus tipo salvaje no puede autoreplicarse, necesitando de otros virus colaboradores, en este caso adenovirus o virus herpes, para completar el ciclo de vida viral (consistente en el rescate, replicación y empaquetamiento de una nueva progenie viral)

[11,63]. En ausencia de virus colaboradores, AAV establece una infección latente en la que su genoma se integra en el ADN cromosómico celular. El genoma de AAV contiene dos largos genes de lectura abierta que codifican: proteínas *rep*, responsables de la replicación del ADN de AAV, y las proteínas *cap*, que forman la cápside del virus (Fig. 2). La región codificadora de proteína está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 bp, que parecen contener todas las secuencias en cis requeridas para la replicación y encapsidación del virus (Fig. 2).

Aunque los recientes avances tecnológicos han aumentado nuestra habilidad para conocer las complejidades del tráfico intracelular de AAV, aún no se comprenden del todo los eventos y procesos que regulan el tráfico de las partículas AAV en el núcleo. Los experimentos *in vitro* indican que una de las rutas utilizadas por este virus para acceder a través de la membrana plasmática puede ser la endocitosis mediada por receptor, vía formación de vesículas de clatrina [21]. Otros estudios han sugerido que los viriones internalizados escapan de los endosomas y son liberados en el citosol al disminuir el pH [26]. Además, las nuevas técnicas de imagen que permiten la monitorización a tiempo real de las trayectorias de los viriones individuales, han mostrado que cada endosoma lleva una sola partícula de AAV [7]. Hay estudios que atribuyen al ensamblaje de microtúbulos y a las proteínas motoras una función en el transporte activo intracelular de AAV. Se ha sugerido también que las partículas de AAV (debido a su muy pequeño tamaño) pueden acceder al núcleo mediante el complejo de poro nuclear (NPC). Sin embargo, la investigación reciente apunta más a un proceso de entrada nuclear que es independiente de la actividad de NPC [101].

Después de alcanzar el núcleo, el AAV tipo salvaje puede integrarse en el genoma hospedador de las células en división y también, con menor frecuencia, en las células quiescentes. Esta integración ocurre preferentemente en un sitio específico del brazo q del cromosoma 19 (AAVS1) [93], necesitándose para ello la proteína viral Rep (ausente normalmente en los vectores actuales de AAV). Por tanto, los vectores AAV comunes permanecen usualmente dentro de los tejidos diana como entidades episomales (en un 90%) aunque pueden también integrarse en un 10% en el genoma de la célula hospedadora [39]. Se discute aún el grado en que los genomas recombinantes son capaces de integrarse en ausencia de funciones Rep. Recientemente se ha demostrado en hepatocitos la integración preferente de los vectores AAV2 en regiones de la cromatina transcripcionalmente activas [77]. Aún no se han identificado los sitios de integración específicos para los otros serotipos de AAV. En comparación a otros vectores virales, los vectores AAV (aunque usualmente son

episomales) pueden llevar a una expresión duradera del transgén.

PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS

En un vector AAV el dominio codificante de proteína (\pm 4.5 Kb) puede ser sustituido por el gen de interés [29,32] (Fig. 2). Los ITRs son los únicos elementos en cis que se necesitan para todas las etapas del ciclo vital de AAV, incluyendo la replicación del ADN viral, la integración cromosómica, y el empaquetamiento del genoma viral. Tales vectores son empaquetados en viriones mediante el suministro en trans de las proteínas de AAV. Esto se consigue transfectando el plásmido vector y el plásmido de empaquetamiento en células infectadas con adenovirus. Como resultado, se generará una mezcla de AAV recombinantes y de adenovirus tipo salvajes. En la ausencia de virus colaboradores, AAV se integrará de manera estable en el genoma de la célula hospedadora y permanecerá en estado latente.

Para producir vectores recombinantes se eliminan todas las secuencias virales excepto los 145 pares de bases de las repeticiones terminales invertidas (ITRs). Esto constituye una ventaja significativa respecto a la seguridad, ya que se impide la generación de virus colaboradores salvajes y se minimiza la posibilidad de reacciones inmunes causadas por la expresión génica viral y que, en contraste, sí pueden generar otros sistemas de vectores virales recombinantes [61,104]. Se ha documentado que AAV es un virus no patogénico al que no se le ha encontrado asociación etiológica con ninguna enfermedad conocida. Hemos comentado que el AAV tipo salvaje se integra específicamente en el cromosoma 19 humano [57], pero los vectores recombinantes no disponen de este sitio de integración específico. Aunque se ha evidenciado la capacidad de integración de los vectores AAV recombinantes en el genoma, los eventos de integración son muy raros. Más bien, el virus recombinante tiende a formar concatémeros episomales muy estables [57,96]. Se conocen actualmente cientos de serotipos de AAV y muchos de estos tienen preferencia por tejidos específicos, como son, hígado, pulmón y músculo [12,19]. Mediante técnicas de bioingeniería se han conseguido mejoras importantes en el empaquetamiento del virus, pudiéndose obtener lotes de producción viral con títulos mayores de 10^{13} partículas virales/ml [20,102]. Existen numerosos sistemas de empaquetamiento viral, pero el más común se basa en una cotransfección transitoria de los plásmidos de AAV [102]. Ha habido también importantes avances en el desarrollo de columnas cromatográficas para purificar las partículas virales. Tras centrifugación en gradiente con cloruro de cesio o iodixanol, se procede a una purificación adicional de las

preparaciones virales en columnas de heparina/agarosa. Esto se basa en los hallazgos recientes de que AAV se une a moléculas de la superficie celular tipo proteoglicanos de heparin sulfato [6,74]. A continuación se procede a la elución, concentración y diálisis del virus. Los avances logrados en la producción del virus han permitido la aplicación de AAV en numerosos estudios preclínicos y clínicos [40,76]. Desde su aislamiento, ha habido un progresivo entendimiento de las propiedades biológicas de los virus adenoasociados, mejorando nuestra habilidad para manipularlos y usarlos como un vector de TG de amplio espectro, seguro y eficiente. Actualmente hay más de 20 ensayos clínicos en marcha que evalúan el uso de vectores AAV para enfermedades genéticas y adquiridas (base de datos de ensayos clínicos: <http://www.wiley.com.uk/genetherapy/clinical/>).

TROPISMO TISULAR CON DIFERENTES VECTORES ADENOASOCIADOS

El AAV humano fue descubierto en 1965 como un contaminante de las preparaciones de adenovirus. Tras el establecimiento en 1982 de los primeros clones infecciosos de AAV2, este virus ha ido ganando rápidamente popularidad en aplicaciones de terapia génica, debido a características como, la falta de patogenicidad, el rango amplio de infectividad, y la habilidad para establecer una expresión del transgén a largo plazo. A medida que se caracterizan más serotipos, y se vayan combinando las cápsides de los diferentes serotipos para obtener nuevos tropismos, será posible que los tejidos con dificultad de ser infectados con serotipos conocidos de AAV sean susceptibles de transferencia génica. Esto contribuirá a la expansión del rango actual de vectores AAV. Los serotipos de AAV comparten una estructura genómica común, pero muestran variación en el tropismo celular y de tejidos, debido a diferencias en las proteínas de su cápside. Ello conlleva un reconocimiento por diferentes receptores de la superficie celular.

La infección de AAV se inicia mediante su unión a receptores de la superficie celular que son serotipo-específicos. Por ejemplo, AAV2 tiene al proteoglicano heparán sulfato (HSPG) como uno de sus receptores principales [85]. La unión a un receptor no es un estímulo suficiente para la internalización viral, la cual, necesita además co-receptores, tales como heterodímeros de integrina, receptor de factor de crecimiento fibroblástico tipo 1 y el receptor de factor de crecimiento de hepatocito, c-Met [25]. HSPG presenta una distribución ubicua en células y tejidos de varias especies. Esto explica en parte el amplio tropismo de este virus en células, humanas, de primates no humanos, caninas, murinas, y de aves. Algunos derivados de ácido siálico actúan como receptores

de AAV4 y AAV5, mientras que el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas es otro determinante celular involucrado en la infección de AAV5 [23]. Los diferentes serotipos de AAV transducen preferentemente diferentes tipos celulares. En general, el tropismo está asociado con la abundancia de los receptores/coreceptores específicos, aunque hay excepciones [27]. Esto sugiere que probablemente hay otras vías de internalización que son independientes de receptores conocidos [24].

En la pasada década la transferencia génica viral ha progresado desde ser meramente una aplicación en investigación animal hasta convertirse en una estrategia terapéutica experimental en humanos. Desde el punto de vista clínico y terapéutico es esencial conocer la distribución en tejidos y la cinética (comienzo, duración y eliminación de la expresión) de los vectores AAV. Hasta ahora se han identificado numerosos serotipos de AAV, con un tropismo variable. El nivel de homología de aminoácidos en la proteína de la cápside de los serotipos 1 a 9 es aproximadamente un 45% [17,36], siendo los serotipos más divergentes los AAV4 y AAV5. Ha habido numerosos estudios en los que se han realizado evaluaciones relativas del tropismo de diferentes serotipos de AAV. En el cerebro se han empleado los serotipos 1, 2 y 5 [12], 7-9 y rh10 (un serotipo de primates), 1, 2, 5, 7 y 8 [86] y 2, 5, 8 y rh10 [83], 8, 9, rh10 y rh43 [45]. Una limitación importante de los estudios previos era que la falta de uniformidad tanto en el diseño de plásmidos, como en la producción, purificación, y ruta de administración, hacían difícil la comparación de las eficiencias de transducción de estos serotipos en los diferentes tejidos. Con objeto de controlar la variabilidad en estos parámetros, se ha estandarizado el diseño de plásmidos, la transfección, purificación, titulación, diálisis, almacenamiento e inyección, para todos los serotipos de AAV examinados. Estas limitaciones se resuelven mediante el empleo de genes marcadores en los que la expresión pueda ser visualizada a diferentes tiempos, haciendo estudios longitudinales en cada animal. Así, cuando se emplea luciferasa como transgén puede evaluarse la actividad de la proteína transgénica, después de la inyección intraperitoneal de su sustrato (luciferina). Esto permite realizar medidas secuenciales en el mismo animal [50-99]. Consecuentemente, las diferencias encontradas en las eficiencias de transducción y en los perfiles de biodistribución serán reflejo exclusivamente de las diferencias en las cápsides de los viriones de estos serotipos. Recientemente se ha estudiado el tropismo y cinética de expresión para 9 serotipos diferentes de AAV, los cuales han sido empaquetados, producidos, purificados e inyectados por la misma ruta sistémica [105]. Esta ruta de administración es terapéuticamente realista, permitiéndose con ella la

expresión específica en tejidos, si se emplean promotores específicos en concierto con la administración de vector. En dicho trabajo se realizó un seguimiento secuencial, en ratones, de la expresión del transgén durante 100 días, y también 9 meses después de la administración intravenosa de los serotipos AAV 1-9 que expresaban el transgén luciferasa (controlado por un promotor/activador temprano de CMV y flanqueado por secuencias ITRs de AAV2) [105]. Las imágenes de bioluminiscencia revelaron tres niveles de expresión: a) en el grupo de expresión baja estaban los serotipos AAV2, 3, 4 y 5; b) AAV1, 6 y 8 pertenecen al grupo de expresión moderada, y c) AAV7 y 9 corresponden al grupo con una expresión alta. Hubo una gran variación en la cinética de expresión entre estos serotipos, siendo AAV7 y 9 los que tuvieron un comienzo más rápido de la expresión, y AAV3 y 4 los de expresión más lenta. Se ha visto también que las dianas primarias para los serotipos 1, 2, 5, 6, 7 y 9 son el hígado y el músculo esquelético, siendo además AAV9 el que indujo mayor expresión génica en corazón. AAV8 y 9 transducían más ubicuamente que otros serotipos, pero fue AAV9 el que generó una expresión más robusta. Dentro del grupo de alta expresión, AAV9 produjo también mayor número de copias de genoma viral en todos los tejidos examinados (especialmente en hígado, corazón y músculo esquelético) excepto en testículos y pulmón. Cabe resaltar que la expresión en los testículos es una importante cuestión de seguridad para la investigación clínica futura con este serotipo.

TRANSFERENCIA GENICA CEREBRAL CON VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS

Las partículas de AAV son actualmente el vehículo preferido de transferencia génica en el SNC, porque no son patogénicas, pueden transducir células posmitóticas (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) [13,62], persisten en las células sin causar mutagénesis insercional, posibilitan una expresión génica a largo plazo en el cerebro (importante para el tratamiento de enfermedades crónicas) y en la médula espinal [51,100], así como en el sistema nervioso periférico, sin ninguna respuesta inmune asociada [16,30]. Además, los vectores AAV son seguros, no tóxicos e incompetentes para replicación. La utilización de vectores AAV para transferencia génica de factores tróficos al SNC provee también el beneficio añadido de producir niveles fisiológicos de la proteína, evitando con ello los efectos colaterales asociados a grandes dosis [89].

La mayor parte de información sobre efectividad y especificidad de los vectores AAV, en el tratamiento de desórdenes del SNC, deriva de estudios en modelos animales en los que se evalúan diferentes vectores, según su potencial para

aminorar los síntomas de una enfermedad o un síndrome. Ahora se dispone de los primeros datos de estudios clínicos, en los que se describe la transferencia génica mediada por vectores AAV en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, y de Canavan (un desorden degenerativo autosómico recesivo) [54].

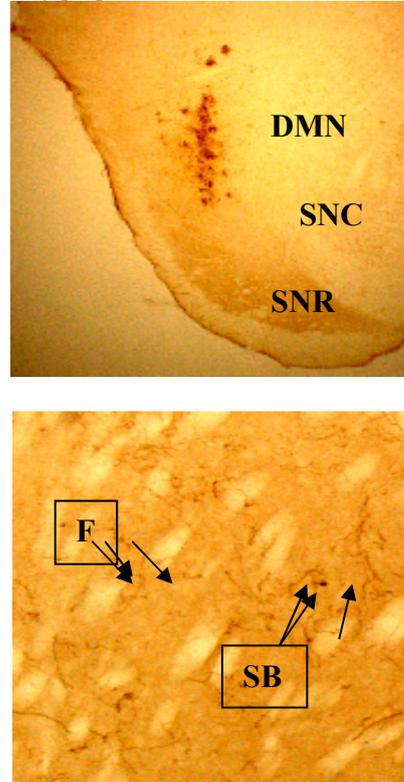


FIG. 1. Procedimiento invasivo de inyección estereotáxica de partículas virales. A) Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) dos semanas después de la inyección de un vector lentiviral en la sustancia negra: evidencia inmunohistoquímica. SNC: sustancia negra compacta; SNR: sustancia negra reticulada; DMN: núcleo mesencefálico profundo. B) Se evidencia el transporte anterógrado, por la detección también de GFP en el estriado. F: fibra; BS: botón sináptico.

Existen actualmente vectores AAV que expresan diferentes proteínas de la cápside, con capacidad de transducir diferentes tipos de células del SNC. La transducción varía según el serotipo de AAV empleado y la región del cerebro inyectada. En el cerebro de ratón, AAV1 y 5 pueden transducir células neuronales y gliales, mientras que AAV2 es capaz de transducir sólo neuronas [22,91]. Aunque AAV2 puede transducir células del sistema nervioso, sólo resultan afectadas las células localizadas en la vecindad del área de inyección. Esto implica la necesidad de realizar múltiples inyecciones o emplear agentes tales como el manitol o heparina, para cubrir áreas más extensas del SNC [57,66]. Recientemente se han descubierto en primates cuatro nuevos serotipos, AAV7, 8, 9 y Rh10, habiéndose examinado sus características de transducción en el cerebro de ratón adulto [15].

Estos vectores parecen transducir específicamente neuronas, y no astrocitos ni oligodendrocitos [15].

La mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII) constituye un sistema ideal para ensayar la eficacia terapéutica de los vectores AAV. MPS VII es una enfermedad de almacenamiento lisosomal causada por una mutación única en el gen de la β -glucuronidasa (GUSB), la cual degrada normalmente los glicosaminoglicanos en los lisosomas [9]. La ausencia de GUSB conduce a una importante acumulación lisosomal de los sustratos no degradados en todo el animal, incluyendo los lisosomas del SNC [49]. La inyección de vectores AAV que transfieren el ADNc de GUSB humano en el cerebro de ratones MPS VII permite generar una distribución amplia de la enzima GUSB, revertiéndose o previniéndose con ello el almacenamiento lisosomal (dependiendo de la edad de tratamiento) [35,68,69]. Aunque las inyecciones en cerebro eran unilaterales, la enzima GUSB fue detectada en el hemisferio contralateral, cuando se emplearon los vectores AAV7, 9 y Rh10. Los patrones cerebrales de distribución enzimática eran diferentes, dependiendo del serotipo empleado. Las inyecciones de Rh10 dieron por resultado grandes cantidades de enzima en el lado inyectado del cerebro, encontrándose una cantidad difusa de la misma en el hemisferio contralateral. Sin embargo, las inyecciones de AAV9 produjeron niveles elevados de GUSB en el hemisferio contralateral, pero estaba concentrada en estructuras específicas, como el hipocampo y los núcleos septales [15]. Rh10 fue más eficiente en transducir células del tálamo y, comparado con AAV Rh10 y AAV8, AAV9 transdujo significativamente más células en el hipocampo. La inyección de AAV9 en hipocampo provocó una saturación tanto del giro dentado como de la región CA1. Las inyecciones de AAV9 provocaron la aparición de células GUSB+ en distintas regiones cerebrales, y también una mayor distribución rostro-caudal del genoma del vector. Además, la inyección de AAV9 en hipocampo indujo la aparición de células positivas al genoma del vector en los núcleos septales, en el hipocampo contralateral (consecuentemente la enzima GUSB que era producida y secretada por las células del hipocampo contralateral podía ser transportada retrógradamente a la corteza entorrinal de ese lado) y en la corteza entorrinal ipsilateral. Todas estas estructuras tienen proyecciones eferentes o aferentes a- o desde el hipocampo, lo que evidencia el transporte de dicho vector [14,15]. Se piensa que las células transducidas con Rh10 pueden estar produciendo más enzima que difunde a sitios más distales, mientras que la inyección con AAV9 lleva al transporte del vector y del enzima a regiones específicas que están conectadas con la región inyectada. Dicha habilidad de transporte del genoma de AAV9 tiene un beneficio potencial en el tratamiento de enfermedades genéticas, en las que

usualmente está afectado todo el cerebro, pudiendo distribuirse el gen terapéutico más lejos de un número limitado de sitios de inyección. Esto podría realizarse actuando en vías de proyección conocidas del cerebro: por ejemplo, una región distal diana para corrección podría ser la corteza entorrinal (afectada en la enfermedad de Alzheimer).

Además de la eficacia de transducción del vector, la duración de la expresión génica depende de la región cerebral diana y del promotor usado. Estudios realizados con el vector AAV2 demuestran que la eficiencia de expresión es más alta en el hipocampo, comparada con la corteza piriforme y el tubérculo olfatorio, y más baja en el estriado [59]. Una forma de aumentar también la expresión génica es mediante el uso de elementos reguladores postranscripcionales, tales como el del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). En trabajos en los que se emplea WPRE combinado con transducciones virales en el estriado e hipocampo se ha encontrado, en ambas regiones, un aumento significativo de la expresión del transgén [52,103].

Entre los promotores que han sido evaluados para transducción viral en el SNC se encuentran los de: citomegalovirus (CMV), enolasa neuronal (NSE), factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo b (PDGF-b) y CMV-actina de pollo (CBA) [82]. El comúnmente empleado promotor de CMV proporciona una expresión génica duradera (hasta de 1 año) aunque la duración de la expresión puede variar según la región cerebral [45,46,47,89]. El promotor de CBA causa una expresión eficiente del transgén que permanece estable hasta 25 meses posinyección [46]. Es importante señalar que el promotor elegido no sólo es crucial para la longevidad de la expresión sino también para la especificidad celular de la transferencia génica. Por ejemplo, aunque el promotor de NSE conduce esencialmente a la transducción de neuronas, en algunas regiones cerebrales (como el cuerpo calloso) puede haber transducción de oligodendrocitos [45,46,47,48]. Por otro lado, se han obtenido algunos resultados sorprendentes con promotores específicos del tipo celular, como el de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP), el cual parecía inducir una transducción exclusiva en neuronas de la médula espinal, del hipocampo y del estriado, habiéndose encontrado sin embargo sólo una transducción del 5% en astrocitos estriatales [71,72]. Por tanto, la especificidad celular conseguida con promotores específicos puede variar mucho entre las diferentes regiones del SNC.

AAV9: UN VECTOR CON CAPACIDAD DE CRUZAR LA BHE

Para terapia génica de enfermedades que afectan áreas extensas del cerebro, la estrategia preferida sería la de administrar los vectores por vía sistémica. El cerebro humano contiene del orden de

100 millones de capilares que abarcan una superficie de aproximadamente 12 m² [8]. Prácticamente cada neurona del cerebro tiene su propio capilar, con una distancia media de capilar a neurona de 8-20 μm [80]. Entonces, la administración de un gen terapéutico a neuronas a través de la membrana capilar sería el método de elección. Sin embargo, hemos visto previamente que la BHE constituye un serio obstáculo a la entrada de macromoléculas en el cerebro.

Trabajos recientes realizados en modelos en roedores de atrofia muscular espinal y de esclerosis lateral amiotrófica han demostrado el potencial de la transferencia génica (empleando virus que sufren transporte retrógrado después de la inyección intramuscular). Este enfoque está explorándose actualmente para ensayos clínicos [4,5,43,75]. Sin embargo, el desarrollo clínico de protocolos de TG con vectores virales para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas puede ser complejo, entre otras cosas, por el número de inyecciones requeridas para tratar las extensas regiones implicadas del SNC, por ejemplo, médula espinal, tronco cerebral y corteza cerebral.

Los vectores AAV, como AAV2, han sido eficaces en varios ensayos clínicos recientes para trastornos neurológicos, habiéndose demostrado una expresión mantenida del transgén, un perfil relativamente seguro, y prometedoras respuestas funcionales. Sin embargo, dichos procedimientos han necesitado de inyecciones quirúrgicas en el parénquima cerebral [42,55,98]. Los serotipos de vectores AAV recién descubiertos, particularmente AAV6, AAV8 y AAV9, posibilitan una transducción extensa en múltiples tejidos, por ejemplo, en músculo esquelético y cardíaco, después de simples inyecciones sistémicas o intraperitoneales [10,41,65,92,93]. Estos serotipos pueden cruzar eficientemente las barreras de las células endoteliales vasculares. Sin embargo, los intentos de transferencia vascular por llegar a tipos celulares ubicados dentro del SNC han sido infructuosos, debido probablemente a que los vectores virales no pueden cruzar la BHE. Los serotipos 6 y 8 de AAV penetran pobremente en el SNC cuando son inyectados vascularmente en ratones neonatos y adultos, expresándose solamente en unas pocas células de la médula espinal [32,33,90]. Otra cosa diferente es el serotipo AAV9, el cual posee características serológicas únicas. Los anticuerpos neutralizantes que se han generado contra los serotipos de AAV1-8 han mostrado poco o ninguna reactividad cruzada con AAV9, indicando que este vector constituye una estirpe diferente de AAV [36,37,38]. Además, comparado con otros serotipos, AAV9 es más fácilmente transportado en el cerebro después de una inyección en el parénquima cerebral [15]. Se sabe también que AAV9 utiliza el receptor de laminina (al igual que AAV2 y AAV8) aunque,

para llevar a cabo la unión, internalización y transducción celular, puede utilizar otros receptores desconocidos [3].

Uno de los logros más importantes ha sido el descubrimiento reciente de la habilidad de AAV9 para dirigirse tanto al cerebro como a la médula espinal, al ser administrado por vía vascular en la cola del ratón, dada la vasta arquitectura y compleja estructura del SNC [33,96,97].

En neonatos, la inyección intravascular de AAV9 indujo una transducción neuronal generalizada con un tropismo aparente en las neuronas motoras y en el ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal. Hubo también una transducción neuronal sustancial en numerosas regiones del cerebro (incluyendo corteza, hipocampo y cerebelo) y, sobre todo, en neuronas con axones largos de proyección. Se desconocen los mecanismos por los cuales los vectores AAV9 transducen poblaciones neuronales específicas.

Según lo esperado, en ratones adultos se observó expresión de GFP en corazón, hígado y músculo esquelético. AAV9 fue capaz de cruzar también las células endoteliales de la BHE para transducir de manera efectiva los astrocitos del cerebro (con modificación de más del 90% de los astrocitos) y de la médula espinal [33,34]. Además, se encontró una expresión neuronal aislada, y localizada sólo en el hipocampo y giro dentado. Hubo ausencia de fibras GFP+ en ganglio de raíz dorsal y una reducción marcada en la transducción de motoneuronas. Sin embargo, se ha descrito recientemente en un modelo felino de atrofia muscular espinal que AAV9 puede cruzar la BHE y transducir tanto los astrocitos como las motoneuronas de la médula espinal [28]. Las similitudes de los hallazgos son positivas para AAV9 y, hasta la fecha, no se conocen las diferencias que expliquen la transducción de las motoneuronas, aunque pueden ser debidas al promotor utilizado o a las especies inyectadas. En todo el eje dorso-ventral de la sustancia gris medular se detectaron astrocitos GFP+, encontrándose los mayores niveles de expresión de GFP en los ratones inyectados con altas dosis. El análisis de imagen de microscopía confocal reveló más de 64% de astrocitos GFP+ en la región lumbar de la médula espinal.

Estos resultados muestran por tanto un patrón de transducción cambiante, es decir, desde ser principalmente neuronal en neonatos, a ser astrocítico en adultos. Es importante señalar que la transducción astrocítica encontrada en adultos depende de la ruta de inyección y del serotipo de vector empleado, y no del grado de pureza del vector [28,13,14].

La transducción astrocítica predominante encontrada en adultos sugiere que AAV9 escapa de la vasculatura cerebral de una manera similar a como lo hace en la vasculatura del músculo esquelético y cardíaco. Resulta interesante esta

habilidad de AAV9 para cruzar el endotelio. Las uniones estrechas del endotelio restringen severamente la penetración a moléculas y virus en la BHE. Para cruzar la BHE AAV9 puede valerse de proteínas de transporte, transcitosis mediada por receptor, transcitosis adsorptiva o de otros mecanismos. Los resultados obtenidos sugieren que, después de atravesar la capa de células endoteliales, AAV9 infecta los pies perivasculares astrocíticos que rodean los capilares cerebrales [1,2]. Por tanto, los astrocitos pueden ser transducidos sólo cuando el virus es expuesto a los pies perivasculares astrocíticos. Hay receptores o canales que pueden ser accesibles cuando se emplea esta ruta de entrada vascular, pero no con inyecciones en el parénquima cerebral [1,2].

Hemos comentado que la estrategia preferida para terapia génica de enfermedades que afectan a áreas extensas del cerebro sería administrar los vectores mediante vía sistémica y, en este sentido, los vectores AAV9 parecen ser prometedores. Los esfuerzos pasados por abrir la BHE han conducido al empleo de compuestos como la bradiquinina o el manitol hiperosmolar. Estas técnicas se practican principalmente en neurooncología, para aumentar el acceso de agentes quimioterapéuticos muy polares a tumores metastásicos cerebrales. Aunque la apertura hiperosmótica de la BHE incrementa la entrada de vectores virales en el cerebro [53,56], la técnica es difícil, molesta y arriesgada (aumenta la entrada de todas las moléculas) y la barrera permanece abierta durante poco tiempo, impidiendo una masiva transducción cerebral. Estos métodos no se emplean generalmente en otras especialidades distintas a la neurooncología clínica.

Los resultados descritos con AAV9 son de gran relevancia, dado el añejo interés por desarrollar vectores que crucen la BHE, y tienen importantes implicaciones para el tratamiento de varias enfermedades que afectan a áreas extensas del SNC. Entre estas: la esclerosis lateral amiotrófica, que afecta progresivamente a todas las motoneuronas de la médula espinal; la enfermedad de Parkinson, en la que están afectadas varias áreas de los ganglios basales, como el caudado, putamen, sustancia negra y núcleo subtalámico; y la enfermedad de Alzheimer, que afecta a toda la corteza, el hipocampo y a importantes regiones subcorticales. La capacidad para transducir los principales tipos celulares del SNC en neonatos sugiere que AAV9 podría emplearse para tratar pacientes jóvenes con enfermedades neuronales [53]. Por ejemplo, las atrofas musculares espinales, la lipofuscinosis cerioide neuronal, la enfermedad de Huntington y las degeneraciones espinocerebelosas. También podrían ser diana de AAV9 una serie de enfermedades que afectan a la microglía, entre estas, las leucodistrofias (por ejemplo: adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Krabbe y enfermedad de Canavan) y

enfermedades relacionadas con los astrocitos, como la enfermedad de Alexander. En pacientes mayores, la transducción de astrocitos podría suministrar factores neurotróficos a las neuronas que degeneran en enfermedades como las anteriormente mencionadas.

La construcción de vectores tipo AAV9 con promotores específicos neuronales o de astrocitos puede añadir especificidad dado que, como se ha descrito previamente, AAV9 puede transducir múltiples tejidos no neuronales tras inyección intravenosa. Habiéndose cruzado el Rubicón, están buscándose los siguientes retos: por ejemplo, determinar si AAV9 cruza la BHE humana, reducir la transducción de órganos periféricos, dirigir este vector a determinadas poblaciones neuronales y gliales, y demostrar la reversión de varias enfermedades cerebrales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto INIPRO Ref. Nº 01/09. y por el Gobierno Autónomo de Canarias.

Bibliografía

1. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 41-53.
2. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 2005; 25: 5-23.
3. Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol.* 2006; 80: 9831-9836.
4. Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND. Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1726-1731.
5. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature.* 2004; 429: 413-417.
6. Bartlett JS, Samulski RJ, McCown TJ. Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 1181-1186.
7. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 2000; 74: 2777-27785.
8. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46: 247-279.

9. Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B, Lyford KA, Maltais LM, Wawrzyniak CJ. Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta-glucuronidase deficiency. *J.Clin Invest.* 1989; 83: 1258-1266.
10. Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller AD, Chamberlain JS. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther.* 2004; 10: 671-678.
11. Blomer U, Ganser A, Scherr M. Invasive drug delivery. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 513: 531-551.
12. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1,2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther.* 2004; 10: 302-317.
13. Carter PJ, Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med* 2000; 6: 17-27.
14. Cearley CN, Vandenberghe LH, Parente MK, Carnish ER, Wilson JM, Wolfe JH. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol Ther.* 2008; 16: 1710-1718.
15. Cearley CN, Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther.* 2006; 13: 528-537.
16. Chen J, Wu J, Apostolova I, Skup M, Irintchev A, Kügler S, Schachner M. Adeno-associated virus-mediated L1 expression promotes functional recovery after spinal cord injury. *Brain.* 2007; 130(Pt 4): 954-969.
17. Chiorini JA, Kim F, Yang L and Kotin RM. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol.* 1999; 73: 1309-1319.
18. Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B and Kotin RM. Cloning of adenoassociated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol.* 1997; 71: 6823-6833.
19. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery *Curr Gene Ther.* 2005; 5: 299-310.
20. Clark KR, Voulgaropoulou F, Johnson PR. A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 1996; 3: 1124-1132.
21. Clément N, Knop DR, Byrne B Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based for clinical studies *Hum Gene Ther.* 2009; 20:796-806.
22. Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:3428-3432.
23. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini J Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med.* 2003; 9:1306-1312.
24. Ding W, Zhang L, Yan Z and Engelhardt JF. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 2005; 12:873-880.
25. Dos Santos R, Beyer-Nardi N. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy *Genet. Mol. Biol.* 2008; 1: 1-11.
26. Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol.* 1999; 73: 10371-10376.
27. Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J and Engelhardt JF. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest.* 2000; 105:1573-1587.
28. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, Fyfe J, Moullier P, Colle MA, Barkats M. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther.* 2009; 17:1187-1196.
29. Einerhand MPW, Valerio D. Viral vector system for bone marrow gene therapy, En: Hematopoietic stem cells. D. Levitt and R. Mertelsmann, Editores. 1995, Marcel Dekker, Inc. New York.
30. Federici T, Boulis N. Gene therapy for peripheral nervous system diseases. *Curr Gene Ther.* 2007; 7: 239-248.
31. Fischer A, Cavazzana-Calvo M Gene therapy of inherited diseases *Lancet.* 2008; 371: 2044-2047.
32. Flotte TR, Carter B. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 1995; 2: 357-362.
33. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 59-65
34. Foust KD, Poirier A, Pacak CA, Mandel RJ, Flotte TR. Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root

- ganglia and lower motor neurons. *Hum Gene Ther.* 2008; 19: 61-70.
35. Frisella WA, O'Connor LH, Vogler CA, Roberts M, Walkley S, Levy B, Daly TM, Sands MS. Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther.* 2001; 3: 351-358.
 36. Gao G, Alvira M, Wang L, Calcedo R, Johnston J and Wilson J. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene. *Therapy Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 11854-11859.
 37. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 2004; 78: 6381-6388.
 38. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 2005; 5: 285-297.
 39. Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther.* 2005; 12: 189-211.
 40. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umaphathi P, Eagle A, Shilling C, Boue D, Martin PT, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 4318-4322.
 41. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* 2006; 14: 45-53.
 42. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, Doring MJ. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet.* 2007; 369: 2097-2105.
 43. Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science.* 2003; 301: 839-842.
 44. Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39: 339-345.
 45. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM and Henning PP. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther.* 2008; 16: 89-96.
 46. Klein RL, Hamby ME, Gong Y, Hirko AC, Wang S, Hughes JA, King MA, Meyer EM. Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain. *Exp. Neurol.* 2002; 176: 66-74.
 47. Klein RL, Lewis MH, Muzyczka N, Meyer EM. Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res.* 1999; 847: 314-320.
 48. Klein RL, Meyer EM, Peel AL, Zolotukhin S, Meyers C, Muzyczka N, King MA. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp. Neurol.* 1998; 150: 183-194.
 49. Levy B, Galvin N, Vogler C, Birkenmeier EH, Sly WS. Neuropathology of murine mucopolysaccharidosis type VII. *Acta Neuropathol.* 1996; 92: 562-568.
 50. Lipshutz GS, Gruber CA, Cao Y, Hardy J, Contag CH and Gaensler KM. *In utero* delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. *Mol Ther.* 2001; 3: 284-292.
 51. Lo WD, Qu G, Sferra TJ, Clark R, Chen R, Johnson PR. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum Gene Ther.* 1999; 10: 201-213.
 52. Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: Implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10: 2295-2305.
 53. Lowenstein PR. Crossing the rubicon. *Nat Biotechnol.* 2009; 27: 42-44.
 54. Mandel RJ, Burger C. Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: Promises and challenges. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004; 6: 482-490.
 55. Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, Bartus RT. Safety and tolerability of intraputaminally delivered CERE-120 (adeno-associated) virus serotype 2-neurturin to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 400-408.
 56. McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J, Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIb mice. *Gene Ther.* 2009; 16: 1340-1352.
 57. McCarty DM, Young SM, Jr., Samulski R. Integration of adeno-associated virus (AAV) and

- recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet.* 2004; 38: 819-845.
58. McCown T Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Curr. Gene Ther.* 2005; 5: 333-338.
 59. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski RJ. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res.* 1996; 713: 99-107.
 60. McCown TJ. Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Curr. Gene Ther.* 2005; 5: 333-338.
 61. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther.* 2007; 7: 316-324.
 62. Monahan PE, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?. *Mol Med Today.* 2000; 6: 433-440.
 63. Myers MW, Laughlin CA, Jay FT, Carter BJ Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2 *J Virol.* 1980; 35: 65-75.
 64. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease *Nat Med.* 2009; 15: 331-337.
 65. Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol.* 2005; 79: 214-224.
 66. Nguyen JB, Sánchez- Pernaute R, Cunningham J, Bankiewicz KS. Convection-enhanced delivery of AAV-2 combined with heparin increases TK gene transfer in the rat brain. *Neuroreport.* 2001; 12:1961-1964.
 67. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res.* 2006; 99: e3-e9.
 68. Pardridge WM Molecular biology of the blood-brain barrier *Mol Biotechnol.* 2005; 30: 57-70.
 69. Passini MA, Lee EB, Heuer GG, Wolfe JH. Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream. *J Neurosci.* 2002; 22: 6437-6446.
 70. Passini MA, Wolfe JH. Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector. *J Virol.* 2001; 75: 12382-12392.
 71. Peel AL, Klein RL Adeno-associated virus vectors: Activity and applications in the CNS *J.Neurosci. Methods.* 2000; 98: 95-104.
 72. Peel AL, Klein RL. Adeno-associated virus vectors: Activity and applications in the CNS. *J.Neurosci. Methods* 2000; 98: 95-104.
 73. Peel AL, Zolotukhin S, Schrimsher GW, Muzyczka N, Reier PJ. Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther.* 1997; 4: 16-24.
 74. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med.* 1999; 5: 71-77.
 75. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med.* 2005; 11: 429-433.
 76. Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve* 2009; 39: 283-296.
 77. Russell DW AAV loves an active genome *Nat Genet.* 2003; 34: 241-242.
 78. Rutledge EA, Halbert CL and Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol.* 1998; 72: 309-319.
 79. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19 *EMBO J.* 1991; 10: 3941-3950.
 80. Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res.* 1999; 58: 312-28.
 81. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus *Science.* 2001; 294:1929-1932.
 82. Shevtsova Z, Malik JM, Michel U, Bahr M, Kugler S. Promoters and serotypes: Targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system *in vitro* and *in vivo.* *Exp. Physiol.* 2005; 90: 53-59.
 83. Sondhi D, Hackett NR, Peterson DA, Stratton J, Baad M, Travis KM, Wilson JM, Crystal RG.

- Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Mol Ther.* 2007; 15: 481–491.
84. Suhr ST, Gage FH. Gene therapy in the central nervous system: the use of recombinant retroviruses *Arch Neurol.* 1999; 56: 287-292. Blömer U, Ganser A, Scherr M Invasive drug delivery *Adv Exp Med Biol.* 2002; 513: 431-451.
 85. Summerford C, Samulski RJ Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 1998; 72: 1438-1445.
 86. Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther.* 2007; 18: 195–206.
 87. Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Blum D, Baekelandt V, Velu T, Brotchi J, Levivier M. Neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease. *Curr Gene Ther.* 2002; 2: 451-483.
 88. Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brotchi J, Levivier M. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J. Gene Med.* 2004; 6 (Suppl 1): S212-222.
 89. Tenenbaum L, Jurysta F, Stathopoulos A, Puschban Z, Melas C, Hermens WT, Verhaagen J, Pichon B, Velu T, Levivier M. Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* 2000; 11: 2277–2283.
 90. Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther.* 2008; 16: 1018-1025.
 91. Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 2003; 10: 1528-1534.
 92. Wang H, Lieber A. A helper-dependent capsid-modified adenovirus vector expressing adeno-associated virus rep78 mediates site-specific integration of a 27-kilobase transgene cassette. *J Virol.* 2006; 80:11699-11709.
 93. Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 2005; 23: 321-328.
 94. Warrington KH Jr, Herzog RW Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer *Hum Genet.* 2006; 119: 571-603.
 95. Weissleder R and Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med.* 2003; 9: 123–128.
 96. Weitzman MD, Thistlethwaite PA Breaking the barriers to global gene delivery *Nat Biotechnol* 2005; 23: 305-306.
 97. Weitzman MD, Young SM, Jr., Cathomen T, Samulski RJ Targeted integration by adeno-associated virus. *Methods Mol Med.* 2003; 76: 201-219.
 98. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM, Christos P, Mazumdar M, Souweidane MM, Kaplitt MG, Crystal RG. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther.* 2008; 19: 463-474.
 99. Wu JC, Sundaresan G, Iyer M and Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther.* 2001; 4: 297–306.
 100. Wu P, Phillips MI, Bui J, Terwilliger EF Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol.* 1998; 72: 5919-5926.
 101. Xiao W, Warrington KH Jr, Hearing P, Hughes J, Muzyczka N Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol.* 2002; 76: 11505-11517.
 102. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol.* 1998; 72: 2224-2232.
 103. Xu R, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, Fitzsimons H, Choi KL, Ma H, Dragunow M, Leone P, Chen Q, Dicker B, During MJ. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes *Gene Ther.* 2001; 8: 1323-1332.
 104. Zaiss AK, Muruve D. Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther.* 2005; 5: 323-331.
 105. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz J. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 2008; 16:1073-1080.
 106. Zlokovic BV Cerebrovascular permeability to peptides: manipulations of transport systems at the blood-brain barrier *Pharm Res.* 1995; 12: 1395-1406.

TABLA.- PRINCIPALES SISTEMAS DE VECTORES VIRALES

Vector viral	Descripción	Ventajas	Limitaciones	Aplicaciones
Adenovirus (Ad)	Icosaédrico; Sin envuelta; Genoma de 36 Kb; No integrativo	Títulos altos; Infecta mayoría de tipos celulares; Inserción de grandes fragmentos de ADN	Alta inmunogenicidad, con importantes respuestas inmunes celulares y humorales que pueden ser fatales.	Terapias que requieren una expresión génica transitoria: Cáncer, Inducción de angiogénesis y vacunas de ADN (por sus propiedades inflamatorias e inmunogénicas).
Retrovirus (incluyendo Lentivirus)	Se integran tanto en células proliferativas (retrovirus y lentivirus) como quiescentes (lentivirus)	Baja inmunogenicidad; posibilidad de inserción de largos fragmentos de ADN (hasta 8 Kb)	Mutagénesis insercional	Enfermedades genéticas de células T y enfermedades hematológicas (Retrovirus), HIV/Sida
Virus Adenoasociados (AAV)	Icosaédrico; Sin envuelta; ADN monocatenario; Genoma de 4.7Kb; Integrativo	Baja inmunogenicidad; Títulos altos; Infecta mayoría de tipos celulares; Expresión génica duradera.	Limitada capacidad para inserción de fragmentos de ADN	Enfermedades genéticas; Tumores; Enfermedades neurológicas, oculares y cardiovasculares.

A)



GEN TERAPÉUTICO

B)



Fig. 2. A) Estructura genómica de los virus adenoasociados. B) Producción de vectores adenoasociados: sustitución de la región codificante del virus por la construcción que contiene el gen terapéutico.