

DON **JOSÉ RAFAEL CASTRO FUENTES**, DOCTOR EN BIOLOGÍA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, ANATOMÍA PATOLÓGICA, HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

CERTIFICA:

Que **D. JOSÉ MIGUEL BRITO ARMAS** ha realizado bajo su dirección y supervisión los trabajos conducentes a la realización de su Tesis Doctoral titulada:

TROPISMO DEL VECTOR DE TERAPIA GÉNICA AAV9 EN EL ENVEJECIMIENTO FISIOLÓGICO: HACIA UNA INTERVENCIÓN BIOGERONTOLÓGICA MOLECULAR

Examinada la presente memoria, me declaro conforme con su contenido y considero que cumple los requisitos académicos y científicos para optar al título de Doctor en Investigación Biomédica Básica y, por consiguiente, ser sometida al juicio del tribunal que proponga la Comisión de Doctorado de la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste donde convenga y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en La Laguna, a 5 de diciembre de 2014.

Dr. José Rafael Castro Fuentes

DON MANUEL RODRÍGUEZ DÍAZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, ANATOMÍA PATOLÓGICA, HISTOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

CERTIFICA:

Que **D. JOSÉ MIGUEL BRITO ARMAS** ha realizado bajo su dirección y supervisión los trabajos conducentes a la realización de su Tesis Doctoral titulada:

TROPISMO DEL VECTOR DE TERAPIA GÉNICA AAV9 EN EL ENVEJECIMIENTO FISIOLÓGICO: HACIA UNA INTERVENCIÓN BIOGERONTOLÓGICA MOLECULAR

Examinada la presente memoria, me declaro conforme con su contenido y considero que cumple los requisitos académicos y científicos para optar al título de Doctor en Investigación Biomédica Básica y, por consiguiente, ser sometida al juicio del tribunal que proponga la Comisión de Doctorado de la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste donde convenga y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en La Laguna, a 5 de diciembre de 2014.

Dr. Manuel Rodríguez Díaz

FINANCIACIÓN

Durante la realización de este trabajo el autor ha sido beneficiario de una beca F.P.I. de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) (Convocatoria 2010, TESIS 10 0022).

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente al profesor Dr. Rafael Castro Fuentes, todo su apoyo, amistad y confianza, por enseñarme los valores del trabajo en equipo y contribuir en mi formación como científico y como persona. Por ayudarme cada vez que lo he necesitado, y por ser prácticamente un padre para mí.

Al Dr. Manuel Rodríguez Díaz por hacerme un hueco en su laboratorio, y por haber sido mi codirector en este trabajo. Sin él, hubiese sido imposible realizarlo.

A los profesores Dres. Tomás González, Rafael Méndez, Miguel Chillón, Agustín Valenzuela, Assumpciò Bosch, Pedro Abreu y Josep Canals, y a los demás miembros de sus laboratorios por poner a mi servicio, de manera desinteresada, sus conocimientos, sus medios y su tiempo.

A Javi, Ingrid, Alberto Sánchez, Alberto Arends, Mingo, Josmar, Ángel, Nacho, Pedro e Ibrahim, por lo que me han ayudado y enseñado, y sobre todo por su amistad. Además, por el día a día, por los cafés diarios y por aguantar mis cosas y mis historias. De ellos también es esta tesis, ya que de otro modo habría sido imposible realizarla.

No puedo olvidarme de los muchos laboratorios que han colaborado en este trabajo de investigación, sin ellos, éste tampoco habría sido posible.

A todas las personas que componen el Departamento de FISIOLOGÍA, por acogerme y considerarme un miembro más.

Por último, quiero dar las gracias también a todos mis amig@s sin concretar sus nombres porque no quiero olvidarme de ninguno, por estar siempre ahí con su incondicional apoyo...

A mis padres y a mis hermanos,
por darme todo su apoyo y cariño

A María José, por su
complicidad y amor incondicional

“A man is as old as his arteries”

THOMAS SYDENHAM, M.D. (1624-1689)

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	10
Introducción	12
1. Envejecimiento: el emperador de las enfermedades crónicas.....	13
2. Cambios fenotípicos, celulares y moleculares en el envejecimiento.....	16
2.1. <i>Envejecimiento del sistema nervioso central</i>	33
2.2. <i>Envejecimiento del sistema cardiaco</i>	35
2.3. <i>Envejecimiento del hígado</i>	36
2.4. <i>Envejecimiento del músculo esquelético</i>	36
2.5. <i>Envejecimiento del sistema circulatorio</i>	37
3. Perspectiva actual del envejecimiento.....	40
4. Intervención biogerontológica.....	41
5. Introducción a la Terapia Génica.....	49
5.1. <i>Tipos de Terapia Génica</i>	50
5.2. <i>Vectores de Terapia Génica</i>	51
5.2.1 Vectores no virales.....	52
5.2.2 Vectores Virales.....	57
5.2.2.1 <i>Vectores Adenovirales</i>	59
5.2.2.2 <i>Vectores basados en virus herpes</i>	60
5.2.2.3 <i>Vectores retrovirales y derivados</i>	61
5.2.2.4 <i>Vectores Adenoasociados</i>	64
Planteamiento, Hipótesis y Objetivos	72
1. Planteamiento.....	73
2. Hipótesis.....	74
3. Objetivos.....	75

Material y métodos	78
1. Animales y tratamiento.....	79
2. Técnicas Morfológicas y de Biología Celular.....	80
2.1. <i>Inmunohistoquímica de eGFP</i>	80
2.2. <i>Inmunofluorescencia</i>	81
2.3. <i>Marcaje con Lectinas</i>	82
2.4. <i>Hibridación In Situ</i>	83
3. Técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular.....	85
3.1. <i>Cuantificación del malondialdehído (MDA)</i>	85
3.2. <i>Inmunotransferencia (western-blot)</i>	85
3.3. <i>Factores neutralizantes de AAV9 en suero</i>	86
3.4. <i>ELISA</i>	87
3.5. <i>Producción, purificación y cuantificación del vector AAV9</i>	88
3.6. <i>Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo real (RT-PCR)</i>	89
3.7. <i>PCR Cuantitativa (qPCR)</i>	91
4. Captura de imágenes.....	91
5. Análisis estadístico.....	92
Resultados	93
Resultados en tejido periférico	94
1. <i>Reducción drástica de la expresión del transgén eGFP en tejidos periféricos de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes</i>	94
2. <i>Descenso significativo en los niveles de la proteína transgénica eGFP en tejidos periféricos de ratones viejos</i>	95
3. <i>La expresión de ARNm de eGFP y el número de partículas virales son menores en los tejidos viejos en comparación con los jóvenes</i>	97
4. <i>No existen factores neutralizantes en suero responsables del menor tropismo de AAV9 en los tejidos de ratones jóvenes</i>	98
5. <i>Reducción de N-glicanos tipo gal-(β1-4) N-GlcNAc en tejidos periféricos de ratones viejos</i>	99
6. <i>Reducción de N-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc en corazón y músculo, pero no en hígado, de ratones viejos</i>	101

7. <i>Disfunción endotelial en los vasos de tejidos periféricos de ratones viejos</i>	103
Resultados en cerebro	107
1. <i>Reducción drástica de la expresión del transgén eGFP en cerebros de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes</i>	107
2. <i>Tipología celular cerebral en ratones jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP</i>	110
2.1. <i>Tropismo de AAV9-eGFP en la BHE</i>	110
2.2. <i>Tropismo astrogial de AAV9-eGFP</i>	111
2.3. <i>Tropismo neuronal de AAV9-eGFP</i>	111
2.4. <i>Tropismo de AAV9-eGFP en Plexo coroideo</i>	114
3. <i>Descenso significativo en los niveles de la proteína transgénica eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos</i>	115
4. <i>Los niveles de ARNm de eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos son menores en comparación con los de jóvenes</i>	117
5. <i>Menor incorporación del AAV9-eGFP en el cerebro de ratones viejos</i> ..	119
6. <i>Reducción de N-glicanos tipo gal-(β1-4) N-GlcNAc en plexos coroideos y epéndimo de ratones viejos</i>	121
7. <i>Aumento de N-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc en regiones cerebrales de ratones viejos</i>	122
8. <i>Disfunción endotelial en los vasos cerebrales de ratones viejos</i>	124
Discusión	126
Conclusiones	139
Bibliografía	142

RESUMEN

RESUMEN

El envejecimiento es el principal factor de riesgo de las enfermedades prevalentes en los países desarrollados. Hoy en día, nuestra comprensión de la determinación de la esperanza de vida es mucho mayor de lo que era en el pasado, pero las intervenciones administrables para la mejora de la longevidad son aún prácticamente escasas. Con el fin de mejorar la longevidad, una de las cuestiones claves que deben ser abordadas es el envejecimiento. Para cerrar la brecha entre el conocimiento de la determinación de la esperanza de vida y su transición a la práctica manipulativa, las tecnologías de transferencia de genes juegan un papel importante. El vector AAV9 presenta la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en roedores neonatos y adultos, además de transducir múltiples órganos periféricos, convirtiéndolo en una herramienta muy eficaz para una intervención biogerontológica molecular. Se desconoce cómo actúa AAV9 durante el envejecimiento, o si podría emplearse para la protección y/o reparación de tejidos durante la senectud. El objetivo principal de este trabajo fue comparar el tropismo del vector AAV9-eGFP en cerebro y órganos diana periféricos de ratones machos C57BL/6J jóvenes y viejos, y estudiar diferentes factores asociados al envejecimiento que puedan influir en el tropismo de dicho vector. Los resultados obtenidos muestran que en el envejecimiento fisiológico se produce una reducción drástica del tropismo de AAV9 en diversas regiones cerebrales y en órganos diana periféricos. Además, la disminución encontrada en el receptor primario de AAV9 asociada al deterioro endotelial propio del envejecimiento, produce un déficit en el transporte vascular de AAV9, con consecuencias en diferentes etapas del ciclo de infección celular viral (transcripción y traducción reducida de eGFP) en tales órganos. Estos resultados permitirán abordar estrategias de intervención enfocadas a retrasar el envejecimiento y las enfermedades relacionadas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento: el emperador de las enfermedades crónicas

Aunque todo el mundo está familiarizado con el término envejecimiento, la definición no es tan sencilla. En términos generales, el envejecimiento se define como un proceso normal asociado con una alteración temporal progresiva de las respuestas homeostáticas adaptativas del organismo, las cuales provocan cambios en la estructura y función de los diferentes sistemas, aumentando la vulnerabilidad del individuo al estrés ambiental y a la enfermedad (www.senescence.info). Esta definición deja muchas interrogantes: si es un proceso normal, ¿por qué existen unos pocos animales carentes de envejecimiento, siendo prácticamente inmortales? ¿Por qué esa alteración progresiva se puede acelerar o enlentecer modificando algunos aspecto puntuales (tanto genéticos, moleculares, fisiológicos o ambientales)? ¿Los cambios en la estructura y función de los diferentes sistemas son causa o consecuencia del envejecimiento? Y lo más importante, ¿es un proceso reversible o no? Como éstas, se pueden plantear cientos de dudas sobre el envejecimiento. Lo que sí parece claro es que la vulnerabilidad a la enfermedad y al estrés ambiental es mucho mayor con el envejecimiento, y que ello conduce tarde o temprano a la muerte (Figura 1). Por eso, esta tesis, se referirá al envejecimiento, como un proceso “dañino”, al menos para el individuo.

Figura 1

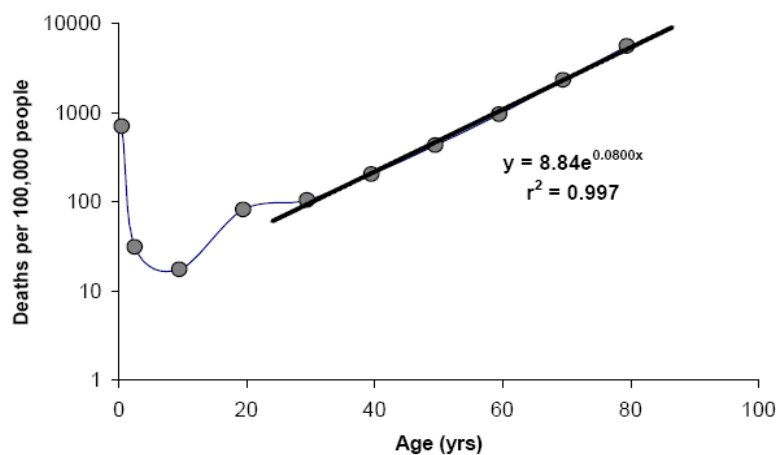


Figura 1: Número de muertes por 100.000 habitantes y por edad. Fuente: National Vital Statistics System, 2010.

El envejecimiento puede también ser definido, de forma más simple, como un deterioro gradual de la función fisiológica, incluyendo una disminución en la fecundidad (Partridge y Mangel, 1999; López-Otin et al, 2013), o como el proceso intrínseco, inevitable e irreversible de la pérdida de viabilidad y el aumento de vulnerabilidad (Comfort, 1964). Es evidente que el envejecimiento humano se asocia con una amplia gama de cambios fisiológicos que no sólo nos hacen más susceptibles a la muerte, como hemos podido comprobar en la figura 1, sino que limitan nuestras funciones normales y nos hace más susceptibles a una serie de enfermedades.

Figura 2

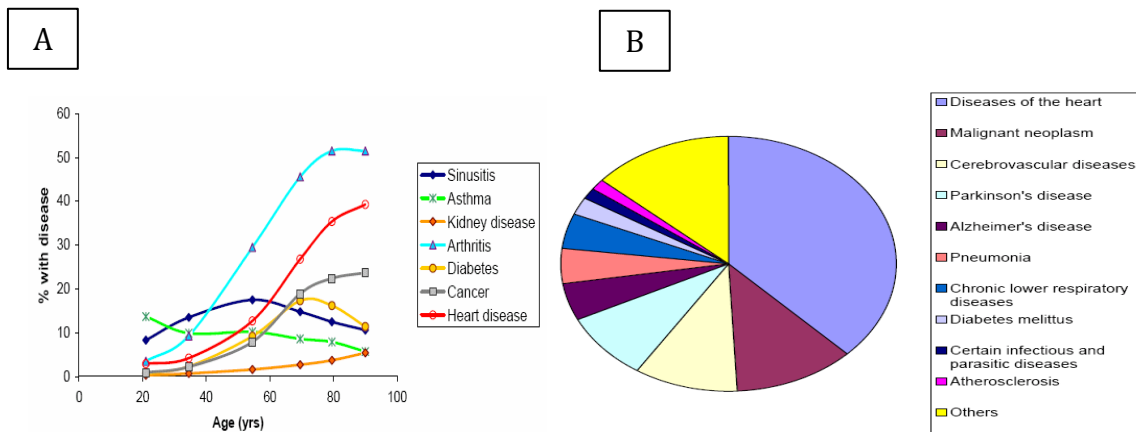


Figura 2. (A) Prevalencia de enfermedades crónicas con la edad. (B) Causa de muerte en personas de 80 o más años. Fuente: National Vital Statistics System, 2010.

En la Figura 2A se muestra el establecimiento con la edad de enfermedades crónicas, mientras que en la Figura 2B se muestra la causa de muerte en ancianos de 80 o más años. No es sorprendente que las enfermedades del corazón sean la causa número uno de muerte en personas de 80 o más años, seguido por el cáncer, las enfermedades cerebrovasculares, el Parkinson y enfermedad de Alzheimer, la neumonía y las enfermedades respiratorias crónicas. Mientras que enfermedades como el cáncer y las enfermedades del corazón son las principales causas de muerte a todas las edades, otras enfermedades, como el Parkinson y el Alzheimer, sólo llegan a ser significativas en la vejez.

Por tanto, con el envejecimiento es mayor la incidencia de las *enfermedades neurodegenerativas*, siendo éste el factor de riesgo más importante para dichas

enfermedades (Figura 2B). En Canarias, por ejemplo, la incidencia del Alzheimer (enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia) ha aumentado en los últimos años hasta afectar al 10 % de la población mayor de 65 años, lo que supone unas 30.000 personas enfermas. Entre los mayores de 80 años, la incidencia de ésta llega al 50 % de la población. La enfermedad de Parkinson (segunda enfermedad neurodegenerativa en incidencia) tiene una incidencia entre 4500 y 7500 enfermos en Canarias (el diagnóstico de la enfermedad es muy difícil, por lo que existe este posible intervalo que representa enfermos diagnosticados y no diagnosticados). Según el crecimiento que están teniendo ambas patologías, en unos diez años casi se duplicará el número de casos (Instituto Canario de Estadística, ISTAC). Las enfermedades neurodegenerativas son muy discapacitantes, y generan un gasto económico mayor con respecto a los gastos farmacológicos y médicos de cualquier enfermedad típica. Se estima que el gasto anual de un enfermo con Alzheimer o Parkinson oscila entre los 17.603 y 32.000 euros (Valdeoriola et al. 2013; Asociación de Familiares de Enfermos de Alzheimer, AFEDAZ), por lo que en Canarias las cifras oscilan en torno a los 600 millones de euros anuales. Este gasto es acometido por asociaciones, ayudas no gubernamentales, pacientes y familiares, donaciones, seguridad social, y ayudas del gobierno de Canarias, gobierno Central y la Unión Europea. Es importante resaltar que dicho gasto será mayor cada año, duplicándose en un futuro próximo (Instituto Canario de Estadística, ISTAC). Hoy en día se desconocen las causas de estas enfermedades, por lo que la terapia actual consiste en el tratamiento de los síntomas con fármacos que lo que hacen es retrasar el progreso de la enfermedad, al menos durante unos meses (en el caso del Alzheimer) o unos años (para la enfermedad de Parkinson) y dependiendo del paciente y de la severidad de la enfermedad. Este tipo de enfermedades podrían tener su causa en alguno/s de los muchos desajustes que ocurren en el envejecimiento, y que veremos a continuación.

Por último, destacar que en la época actual la población humana tiene una esperanza de vida más larga que la de años atrás y, con el paso del tiempo, esta esperanza de vida ha ido aumentando progresivamente, llevando con el tiempo a un envejecimiento de la población. En Canarias el índice de envejecimiento de la población (mayores de 65 años) era de un 13% en el 2007, y en el 2010 era de un 16%. Si se sigue el patrón de crecimiento, para el año 2030 la población envejecida será casi de un 40% (Instituto Canario de Estadística, ISTAC) (Figura 3). Sumado ello al gasto social y a la

incidencia de múltiples enfermedades asociadas al envejecimiento (incluidas las neurodegenerativas), esto hace que hoy en día se cambie la estrategia de investigación, empezando a incluirse el factor envejecimiento en los modelos actuales de investigación biomédica.

Figura 3

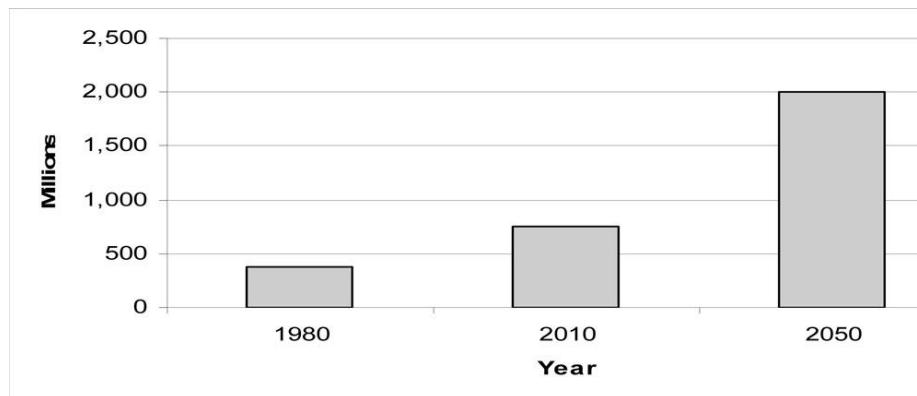


Figura 3. *Personas de 60 o más años durante diferentes intervalos temporales (estimación para 2050). Fuente: Instituto Canario de Estadística, ISTAC*

2. Cambios fenotípicos, celulares y moleculares en el envejecimiento

En los seres humanos, algunas funciones como la audición y la flexibilidad comenzarán a deteriorarse desde muy al principio de la vida (Bowen y Atwood, 2004). Sin embargo, la mayor parte del deterioro funcional de nuestro cuerpo tiende a comenzar después del mayor pico sexual, más o menos, a los 19 años. Contrariamente a las mediciones demográficas de envejecimiento que muestran tasas exponenciales de mortalidad crecientes, el deterioro funcional humano tiende a ser lineal (Strehler, 1999). El envejecimiento se caracteriza por cambios en la apariencia (Figura 4) tales como, una reducción gradual de la altura y de la pérdida de peso (debido a la pérdida de masa muscular y ósea), una tasa metabólica más baja, tiempos de reacción más largos, alteraciones de la función motora, reducción en ciertas funciones como la memoria, y la actividad sexual, una disminución funcional en la audición, el olfato y la visión, baja capacidad pulmonar, emblanquecimiento del vello, arrugas por pérdida de elasticidad en la piel, etc...(Craik y Salthouse, 1992; Hayflick, 1994; Spence, 1995).

Figura 4

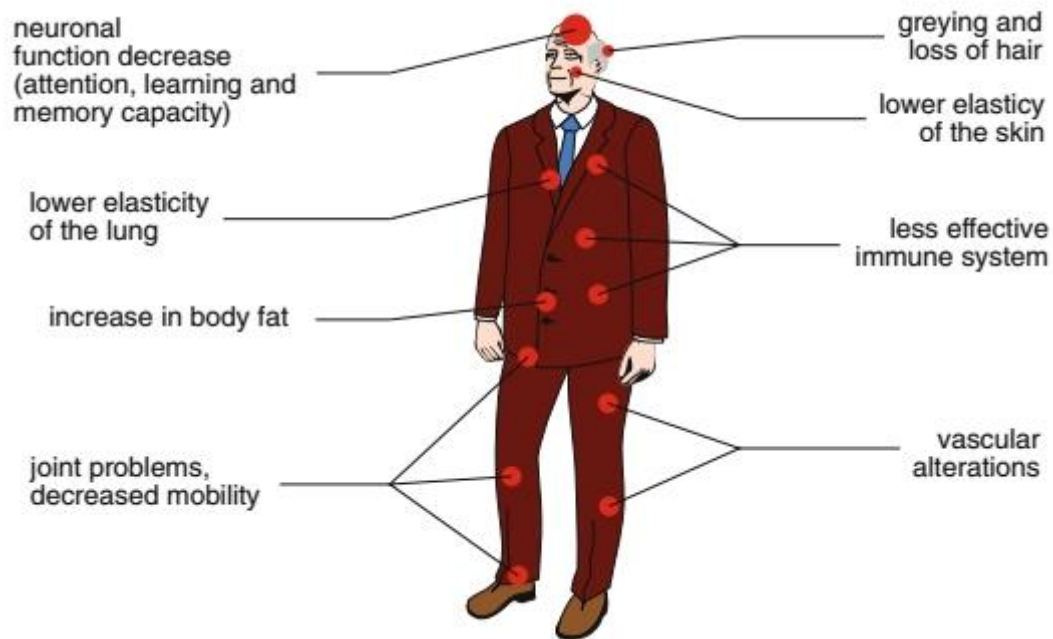


Figura 4. Algunos cambios fenotípicos en el envejecimiento. Fuente: *Cell aging: Molecular mechanisms and Implications for diseases*, 2014.

Aunque con la edad se deteriora el sistema inmune (inmunosenescencia), una característica importante del envejecimiento es un aumento en los niveles basales de inflamación, y que se refleja en mayores niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias que pueden contribuir a varios trastornos relacionados con la edad, tales como, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis y la artritis (Franceschi et al., 2000; Bruunsgaard et al., 2001). Algunos de los cambios relacionados con la edad, como la presbicia (causada por el endurecimiento continuo del cristalino, impidiendo enfocar objetos cercanos) parece ser universal al envejecimiento propio del ser humano (Finch, 1990; Hayflick, 1994).

En el fenotipo de envejecimiento humano prácticamente cualquier sistema, tejido u órgano, suele fallar (Austad, 1997; Strehler, 1999). Esto indica la existencia de un fenómeno intrínseco que afecta a todo el organismo y que conduce a la muerte. Curiosamente, los estudios en supercentenarios, es decir, en las personas mayores de 110 años de edad, sugieren que estos individuos envejecen uniformemente. No obstante, son extremadamente frágiles y débiles, mostrando múltiples patologías (Coles, 2004). Estudios de autopsias realizadas en centenarios revelan que todos, incluso los que se

describen como saludables antes de la muerte, han tenido un fallo orgánico agudo que les causó la muerte. Estos resultados también sugieren la idea de que la expresión “morir de viejo” es incorrecta (Berzlanovich et al., 2005).

A nivel fisiológico, el envejecimiento induce también una serie de cambios, tales como, reducción en los recuentos de células, deterioro de las proteínas tisulares, atrofia tisular, reducción de los fluidos corporales, alteración de casi todas las vías metabólicas (de la glucosa, ácidos grasos, colesterol, metabolismo del calcio...). Además, hay deterioro de algunos sistemas, como del sistema excretor, del sistema inmune (como se ha mencionado anteriormente) y del sistema circulatorio.

Si seguimos bajando en la escala, podemos apreciar los cambios celulares y moleculares que se producen en el envejecimiento (lo que se conoce como *senescencia*) y que dan lugar al fenotipo del envejecimiento:

- a) **Inestabilidad genómica:** Un denominador común de la senescencia es la acumulación de daños genéticos durante la vida (Moskalev et al., 2012) (Figura 5). Por otra parte, numerosas enfermedades de envejecimiento prematuro, como el síndrome de Werner o el síndrome de Bloom, son consecuencia de la acumulación de daños en el ADN (Burtner y Kennedy, 2010); pero a pesar de la relevancia de éstos y otros síndromes progeroides, los cambios del envejecimiento normal siguen sin resolverse, debido en parte al hecho de que sólo recapitulan algunos aspectos del envejecimiento, pero no todos. La integridad y la estabilidad del ADN es continuamente agredida por agentes exógenos, tanto físicos, químicos y biológicos, así como por amenazas endógenas, incluyendo errores en la replicación de ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas, y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hoeijmakers, 2009). Las lesiones genéticas tanto extrínsecas como intrínsecas son muy diversas e incluyen mutaciones puntuales, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, acortamiento de los telómeros y la interrupción de genes causada por la integración de virus o transposones. Para minimizar estas lesiones durante el periodo vital, los organismos han desarrollado durante la evolución redes complejas de mecanismos de reparación del ADN (las cuales disminuyen con la edad) capaces de disminuir la mayor parte del daño infringido al ADN nuclear (Lord y Ashworth, 2012). Los sistemas de estabilidad genómica también incluyen mecanismos específicos que

mantienen la longitud adecuada y la funcionalidad de los telómeros, y aseguran la integridad del ADN mitocondrial (ADNmt) (Blackburn et al., 2006; Kazak et al., 2012).

Figura 5

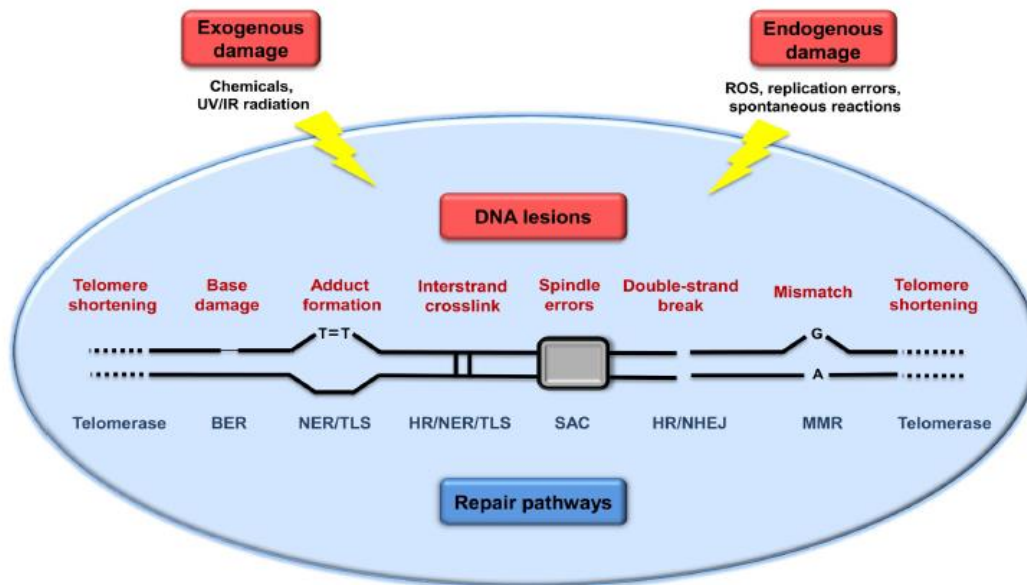


Figura 5. Esquema representativo de los daños ocasionados por agentes endógenos y/o exógenos. Fuente: Moskalev et al., 2012.

Todas estas alteraciones del ADN pueden afectar a genes esenciales y a rutas de transcripción, lo que lleva a las células a ser disfuncionales, por lo que si no se eliminan por apoptosis o senescencia, pueden poner en peligro el tejido y la homeostasis del organismo. Esto es especialmente relevante cuando los daños del ADN recaen en la funcionalidad de las células madre, comprometiendo así su papel en la renovación de los tejidos (Rossi et al., 2008; Jones y Rando, 2011).

Las mutaciones y deleciones en el ADNmt durante la vida del individuo pueden contribuir también al envejecimiento (Park y Larsson, 2011). El ADNmt se ha considerado un objetivo importante de estudio de senescencia, debido a las mutaciones somáticas asociadas al microambiente oxidativo de la mitocondria, a la falta de protección del ADNmt por las histonas, y a la limitada eficacia de los mecanismos de reparación en comparación con los del ADN nuclear (Linnane et al., 1989). La implicación causal de mutaciones en el ADNmt durante el

envejecimiento ha sido motivo de controversia, debido a la multiplicidad de los genomas mitocondriales que permiten la co-existencia de genomas mutados y genomas salvajes en la misma célula, un fenómeno que se conoce como 'heteroplasmia'. A pesar del bajo nivel general de mutaciones en el ADNmt, la carga mutacional durante el envejecimiento en las células individuales se convierte en significativa, pudiendo alcanzar un estado de homoplasmia, en el que un genoma mutado domina al normal (Khrapko et al., 1999). Más evidencias causales vienen dadas a partir de estudios realizados en ratones deficientes en la ADN-polimerasa γ . Estos ratones mutantes exhiben fenotipos de envejecimiento prematuro y tienen menor esperanza de vida asociada a la acumulación de mutaciones aleatorias puntuales y a deleciones en el ADNmt (Trifunovic et al., 2004; Kujoth et al., 2005; Vermulst et al., 2008).

Además del daño nuclear genómico y en el ADNmt, las láminas nucleares pueden causar también la inestabilidad del genoma (Dechat et al., 2008), ya que éstas proporcionan la estructura del núcleo y producen desajustes en la entrada y salida de moléculas (como proteínas estabilizadoras de la cromatina, factores de transcripción, etc...). Este hecho se descubrió investigando mutaciones de genes que codifican para componentes de la lámina nuclear y factores de maduración para dichas proteínas, pues éstos producían los síndromes progericos de Hutchinson-Gilford y Néstor-Guillermo (HGPS y NGPS, respectivamente) (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Cabanillas et al., 2011). La isoforma mutada de pre-lamina nuclear (llamada ahora progerina) se ha detectado también durante el envejecimiento normal humano (Scaffidi y Misteli, 2006; Ragnauth et al., 2010).

Estas evidencias indican que el daño genómico acompaña al envejecimiento y que su inducción artificial puede provocar fenotipos de envejecimiento acelerado.

- b) Acortamiento de telómeros:** La acumulación de daño en el ADN con la edad parece ocurrir de forma azarosa, pero hay algunas regiones cromosómicas, tales como los telómeros, que son particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad (Blackburn et al., 2006). Las DNA-Polimerasas carecen de la capacidad para copiar por completo los extremos terminales de las moléculas lineales de ADN, una función que es llevada a cabo por otra DNA-polimerasa

especializada, conocida como *telomerasa*. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas de mamíferos no expresan telomerasa, y esto conduce a la pérdida progresiva y acumulativa de las secuencias de los telómeros en los extremos de los cromosomas. Este desgaste de los telómeros explica la capacidad de proliferación limitada de algunos cultivos celulares, la conocida como senescencia replicativa (Hayflick y Moorhead, 1961; Olovnikov, 1996). De hecho, la expresión exógena de telomerasa es suficiente para conferir la inmortalidad a las células, sin causar transformación oncogénica (Bodnar et al., 1998). Es importante destacar que también se observa un acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento normal, tanto en ratones (Blasco, 2007) como en humanos (López Otín et al., 2013). Otra peculiaridad de los telómeros, no es sólo el acortamiento sino la progresiva ausencia de telomerasa. En seres humanos, dicha deficiencia de telomerasa se asocia al desarrollo prematuro de enfermedades, tales como fibrosis pulmonar, diqueratosis congénita y anemia aplásica, que implican la pérdida de la capacidad regenerativa de diferentes tejidos (Armanios y Blackburn, 2012). Modelos animales genéticamente modificados han establecido vínculos causales entre la pérdida de los telómeros, la senescencia celular y envejecimiento del organismo. Es decir, el acortamiento o alargamiento inducido de los telómeros en los ratones hace que disminuya o aumente, respectivamente, su esperanza de vida (Rudolph et al., 1999; Tomas-Loba et al., 2008; Armanios et al., 2009). La evidencia reciente indica también que el envejecimiento puede ser revertido por la activación de la telomerasa. En particular, el envejecimiento prematuro en ratones deficientes en telomerasa se puede revertir cuando la telomerasa se reactiva genéticamente en estos ratones (Jaskelioff et al., 2011). Por otra parte, el envejecimiento fisiológico normal se puede retrasar, sin aumento de la incidencia de cáncer, en ratones normales adultos, mediante activación farmacológica o transducción viral sistémica de la telomerasa (Bernardes de Jesús et al., 2012). En los seres humanos, meta-análisis recientes han indicado una fuerte relación entre la longitud de los telómeros y el riesgo de mortalidad, sobre todo en las edades más jóvenes (Boonekamp et al., 2013).

- c) **Alteraciones epigenéticas:** Una variedad de alteraciones epigenéticas afecta a todas las células y tejidos del organismo durante toda la vida (Talens et al., 2012) (Figura 5). Los cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN, modificación postraduccional de las histonas y remodelación de la cromatina. Esto constituye marcas asociadas a la edad. Además, los múltiples sistemas enzimáticos que aseguran la generación y mantenimiento de los patrones epigenéticos normales incluyen ADN-metil-transferasas, histonas desacetilasas, acetilasas, metilasas y desmetilasas, así como complejos de proteínas implicados en la remodelación de la cromatina.

Figura 6

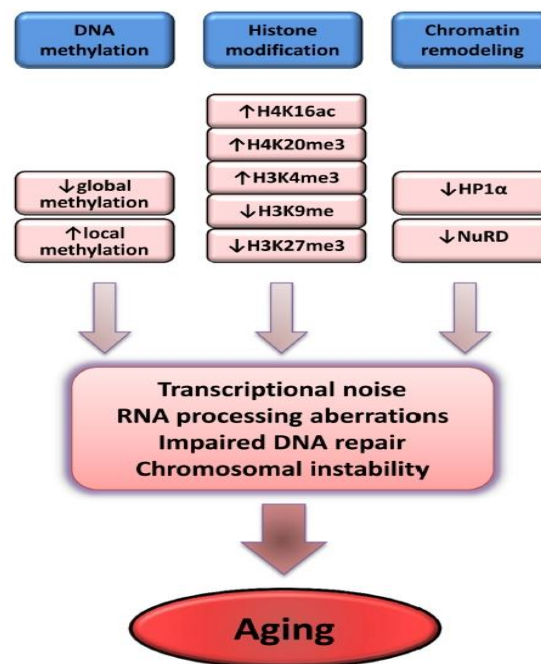


Figura 6. Esquema de cambios epigenéticos asociados al envejecimiento. Fuente: Talens et al., 2012.

- d) **Alteraciones transcripcionales:** El envejecimiento se asocia con un aumento de errores durante la transcripción (Bahar et al., 2006), una producción aberrante e incorrecta maduración de muchos ARN-mensajeros (Nicholas et al., 2010; Harries et al., 2011). Comparaciones basadas en *microarrays* de tejidos jóvenes y viejos de varias especies establecen cambios transcripcionales relacionados con genes

que codifican componentes clave de vías mitocondriales, vías de degradación lisosomales, etc... (De Magalhaes et al., 2009). Estos defectos de transcripción asociados al envejecimiento afectan también a los ARN no codificantes, incluyendo una clase de micro-ARNs (Gero-miRs) que tiene influencia en la longevidad mediante regulación de las células madre. (Ugalde et al., 2011; Boulias y Horvitz, 2012; Toledano et al., 2012). Dichas funciones de los Gero-miRs han sido confirmadas en estudios de modulación de longevidad realizados en *Drosophila melanogaster* y *C. elegans* (Liu et al., 2012; Shen et al., 2012; Smith-Vikos y Slack, 2012).

- e) **Pérdida de proteostasis:** El envejecimiento y algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento están vinculados a la homeostasis de proteínas alteradas o lo que se conoce como *proteostasis* (Powers et al., 2009) (Figura 7). La proteostasis implica la existencia de mecanismos para la estabilización de proteínas correctamente plegadas, y lo componen la mayoría de las proteínas de choque térmico (HSP) así como los mecanismos de degradación de proteínas por el proteosoma o el lisosoma (Mizushima et al., 2008; Hartl et al., 2011; Koga et al., 2011). Por otra parte, hay reguladores de proteo-toxicidad relacionada con la edad, tales como MOAG-4, que actúan a través de una vía alternativa distinta de chaperonas moleculares y proteasas (Van Ham et al., 2010). Todos estos sistemas funcionan de manera coordinada para restablecer la estructura correcta de polipéptidos mal plegados o eliminarlos y degradarlos completamente; por lo tanto, su función es la prevención de acumulación de componentes proteicos dañados y asegurar la continua renovación de las proteínas intracelulares. Muchos estudios han demostrado que la proteostasis está alterada en el envejecimiento (Koga et al., 2011). Además, la expresión crónica de proteínas mal plegadas y agregados de ellas, contribuyen al desarrollo de algunas patologías relacionadas con la edad, como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o las cataratas (Powers et al., 2009).

Figura 7

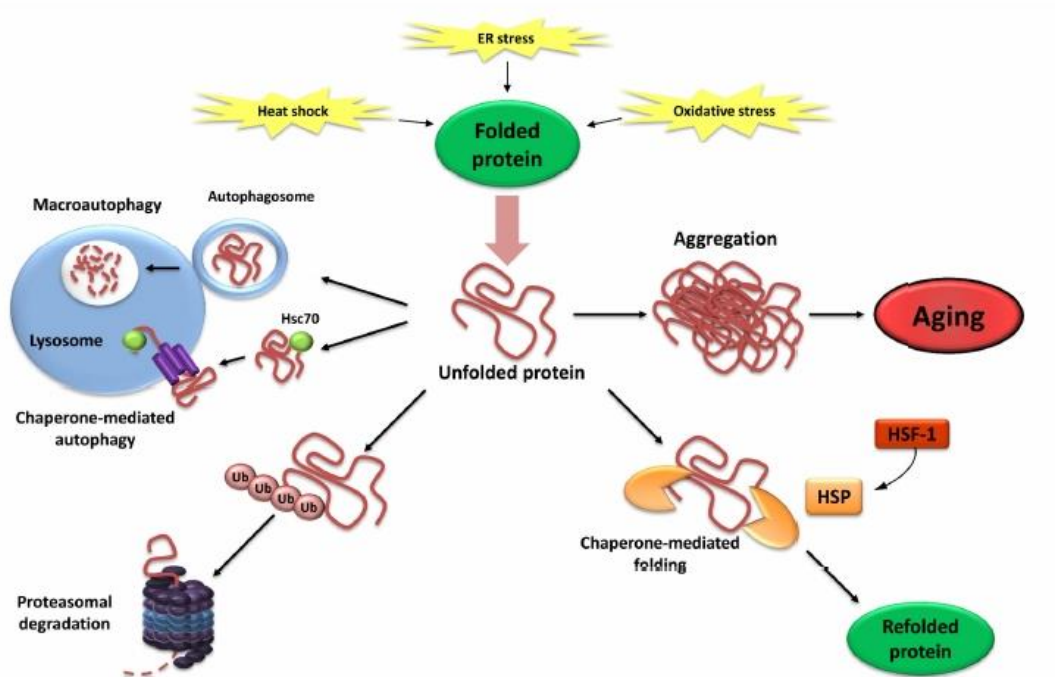


Figura 7. Esquema de pérdida de la proteostasis .Fuente: Powers et al., 2009

La síntesis de chaperonas específicas inducida por el estrés en los orgánulos citosólicos está significativamente alterada en el envejecimiento (Calderwood et al., 2009). Un gran número de modelos animales apoyan este hecho, lo cual se corrobora con una disminución de la longevidad. En particular, los gusanos y moscas transgénicas en los que se sobreexpresan chaperonas alargan considerablemente la vida (Walker y Lithgow, 2003; Morrow et al., 2004). Además, ratones mutantes deficientes en chaperonas presentan fenotipos de envejecimiento acelerado, mientras que la sobreexpresión de ellas hace que aumente su longevidad (Min et al., 2008; Swindell et al., 2009). Incluso, en varios modelos (cultivos celulares, nematodos, roedores, etc...) la activación de factores de transcripción para proteínas HSP como el factor HSF-1 (directamente o desactivándolo por medio de SIRT1) prolongan la vida (Hsu et al., 2003; Westerheide et al., 2009; Alavez et al., 2011; Chiang et al., 2012; Gehrig et al., 2012; Calamini et al., 2012).

La actividad de los dos principales sistemas proteolíticos implicados en el control de calidad de las proteínas, el sistema de autofagia lisosomal y el sistema ubiquitina-proteasoma, disminuyen con el envejecimiento (Rubinsztein et al., 2011; Tomaru et al., 2012). Las intervenciones que utilizan inductores químicos de macro-autofagia (otro tipo de autofagia diferente de la autofagia mediada por chaperonas) han suscitado un interés extraordinario, después del descubrimiento de que la administración constante o intermitente de la rapamicina (un inhibidor de mTOR) puede aumentar la esperanza de vida de ratones de mediana edad (Harrison et al., 2009; Blagosklonny, 2011). En particular, la rapamicina retrasa múltiples aspectos del envejecimiento en ratones (Wilkinson et al., 2012). El aumento de la esperanza de vida que se consigue con la rapamicina es estrictamente dependiente de la inducción de la autofagia (Bjedov et al., 2010; Rubinsztein. et al., 2011). La espermidina, otro inductor de macroautofagia que a diferencia de la rapamicina no tiene efectos inmunosupresores, promueve también la longevidad en levaduras, moscas y gusanos mediante la inducción de autofagia (Eisenberg et al., 2009). Del mismo modo, la administración de suplementos de nutrientes preparados a base de poliaminas que contienen espermidina, o preparados con precursores de poliaminas (que serán transformados por la flora intestinal en poliaminas) aumentan la longevidad en ratones (Soda et al., 2009; Matsumoto et al., 2011). La suplementación dietética con ácidos grasos poliinsaturados como los ω -6 también amplían la esperanza de vida en los nematodos, mediante activación de la autofagia (O'Rourke et al., 2013).

En relación con el proteasoma, la activación del EGF (*epidermal growth factor*) extiende la longevidad en nematodos, debido al aumento de la expresión de diversos componentes del sistema ubiquitina-proteasoma (Liu et al., 2011a). Asimismo, la mejora de la actividad del proteasoma con el uso de inhibidores de des-ubiquitilasas o con activadores del proteasoma que aceleran la eliminación de proteínas tóxicas, también resulta beneficioso en cultivos de células humanas (Lee et al., 2010), y extiende la esperanza de vida en levaduras (Kruegel et al., 2011). Por otra parte, el aumento de expresión de la subunidad del proteasoma RPN-6, empleando el factor de transcripción FOXO, confiere resistencia al estrés proteotóxico y extiende la longevidad en *C. elegans* (Vilchez et al., 2012).

f) **Desregulación de sensores nutricionales:** El principal componente regulador nutricional en mamíferos es la hormona del crecimiento (GH), producida por la glándula pituitaria anterior. Su mediador secundario, el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), es producido en respuesta a la GH por muchos tipos de células, en particular los hepatocitos. La vía intracelular de señalización de IGF-1 es la misma que la provocada por la insulina en las células, en presencia de glucosa. Sorprendentemente, esta vía es la más conservada evolutivamente en el control del envejecimiento y, entre sus múltiples objetivos, está la activación de la familia de factores de transcripción FOXO y de los complejos de mTOR, los cuales se hayan implicados también en el envejecimiento (Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010; Barzilai et al., 2012). Los polimorfismos genéticos o mutaciones que reducen las funciones de GH, receptores de IGF-1, receptores de insulina o efectores intracelulares en la cascada de señalización de esta vías, como AKT, mTOR y FOXO, han sido vinculados a la longevidad, tanto en humanos como en modelos animales, reforzando así el impacto de las vías tróficas y bioenergéticas sobre la longevidad (Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010; Barzilai et al, 2012) (Figura 8).

Figura 8

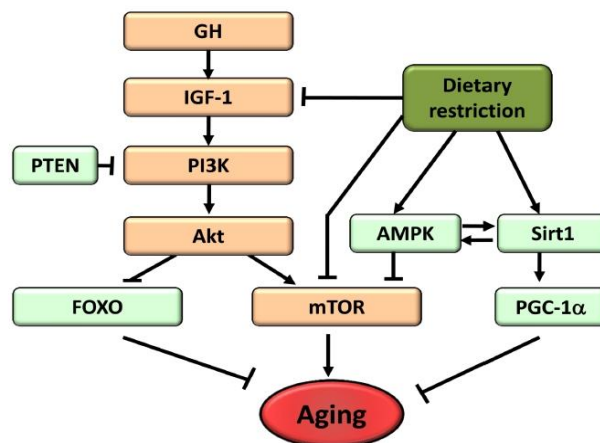


Figura 8. Cambios metabólicos relacionados con el envejecimiento. Fuente: López-Otín et al., 2013.

En consonancia con las vías tróficas y bioenergéticas relacionadas con el envejecimiento, la restricción calórica (RC) aumenta la esperanza de vida y de salud en todas las especies eucariotas investigadas, incluyendo organismos

unicelulares y pluricelulares de varios filos distintos, incluidos primates no humanos (Colman et al., 2009; Fontana et al., 2010; Mattison et al., 2012).

g) Disfunción mitocondrial: Durante el envejecimiento disminuye la eficacia de la cadena respiratoria y, por tanto, aumenta la fuga de electrones reduciéndose la formación de ATP (Green et al., 2011). La relación existente entre la disfunción mitocondrial y el envejecimiento se ha sospechado durante mucho tiempo, pero la disección de sus detalles sigue siendo en la actualidad un reto importante de investigación. La teoría de los radicales libres mitocondriales propone que la progresiva disfunción mitocondrial lleva a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que a su vez provocan un mayor deterioro mitocondrial y un daño celular generalizado (Harman, 1965). Existen múltiples datos que apoyan el papel de ROS en el envejecimiento, pero nos centraremos aquí en el desarrollo de los últimos cinco años, lo que ha obligado a una intensa re-evaluación de la teoría mitocondrial de radicales libres en el envejecimiento (Hekimi et al., 2011). De especial impacto ha sido la inesperada observación de que el aumento de ROS puede prolongar la esperanza de vida en la levadura y en *C. elegans* (Doonan et al., 2008; Van Raamsdonk y Hekimi, 2009; Mesquita et al., 2010). Sin embargo, en ratones, las manipulaciones genéticas que aumentan el daño por ROS no prolongan sino que aceleran el envejecimiento (Van Remmen et al., 2003; Zhang et al., 2009). Las manipulaciones que aumentan la defensas antioxidantes no extienden la longevidad (Pérez et al., 2009) y, además, manipulaciones genéticas que alteran la función mitocondrial (sin aumentar ROS) aceleran el envejecimiento (Trifunovic et al., 2004; Kujoth et al., 2005; Vermulst et al., 2008; Edgar et al., 2009; Hiona et al., 2010). Éstos y otros resultados han allanado el camino para una reconsideración del papel de ROS en el envejecimiento (Ristow y Schmeisser, 2011). Los efectos dañinos de ROS quedan en entredicho, en el campo de la señalización intracelular, ya que hay pruebas de que los ROS activan señales proliferativas y de supervivencia, en respuesta a señales fisiológicas y a condiciones de estrés (Sena y Chandel, 2012). Este nuevo marco conceptual pone en duda si los ROS tienen efectos positivos, negativos o neutros en el envejecimiento.

La disfunción mitocondrial puede contribuir al envejecimiento, independientemente de ROS, como se mencionó anteriormente, en ratones

deficientes en DNA-polimerasa γ (Edgar et al., 2009; Hiona et al., 2010) (ver más arriba Inestabilidad Genómica). Esto puede ocurrir a través de numerosos mecanismos, por ejemplo, las deficiencias mitocondriales pueden afectar a la señalización de apoptosis, haciendo las mitocondrias más permeables a sustancias en respuesta al estrés (Kroemer et al., 2007), y desencadenando reacciones inflamatorias favorecidas por ROS (Green et al., 2011). Además, puede impactar directamente en la señalización celular, en las interconexiones entre organelas, en las membranas mitocondriales e incluso en el retículo endoplasmático (Raffaello y Rizzuto, 2011). Con el envejecimiento, la reducción de la eficiencia bioenergética mitocondrial puede ser consecuencia de múltiples mecanismos convergentes, incluyendo la reducción de la biogénesis de las mitocondrias, el desgaste de los telómeros o la represión de PGC-1 α y PGC-1 β (Sahin y DePinho, 2012). Esta disfunción mitocondrial se produce también durante el envejecimiento fisiológico en los ratones normales, y puede ser parcialmente revertida por la activación de la telomerasa (Bernardes de Jesús et al., 2012). SIRT1 está implicado en la biogénesis mitocondrial a través de un proceso en el que interviene el co-activador transcripcional PGC-1 α (Rodgers et al., 2005) y la eliminación de las mitocondrias dañadas por autofagia (Lee et al., 2008). SIRT3, que es la principal desacetilasa mitocondrial (Lombard et al., 2007), controla muchas enzimas implicadas en el metabolismo energético, incluidos los componentes de la cadena respiratoria, ciclo del ácido tricarboxílico, cetogénesis y la β -oxidación de ácidos grasos (Giralt y Villarroya, 2012). Además, puede controlar también directamente la tasa de producción de ROS por desacetilación de la manganeso superóxido dismutasa, una importante enzima antioxidante mitocondrial (Qiu et al., 2010; Tao et al., 2010). Colectivamente, estos resultados apoyan la idea de que las sirtuinas actúan como sensores metabólicos que controlan la función mitocondrial y juegan un papel protector contra las enfermedades asociadas a la edad. Otros mecanismos que causan disfunción bioenergética mitocondrial son la acumulación de mutaciones y deleciones en el ADNmt, la oxidación de proteínas mitocondriales, la desestabilización de la organización macromolecular de la cadena respiratoria, los cambios en la composición lipídica de las membranas mitocondriales, las alteraciones en la dinámica mitocondrial resultante del desequilibrio de los eventos de fisión y de fusión, y el control defectuoso del *turn-over* mitocondrial por mitofagia (un orgánulo específico de la macroautofagia que

se dirige a las mitocondrias para su degradación proteolítica) (Wang y Klionsky, 2011). La combinación del aumento de los daños y la reducción del *turnover* mitocondrial, debido a la menor biogénesis y a la reducción en los procesos de purificación mitocondrial, pueden contribuir al proceso de envejecimiento (Figura 9).

Figura 9

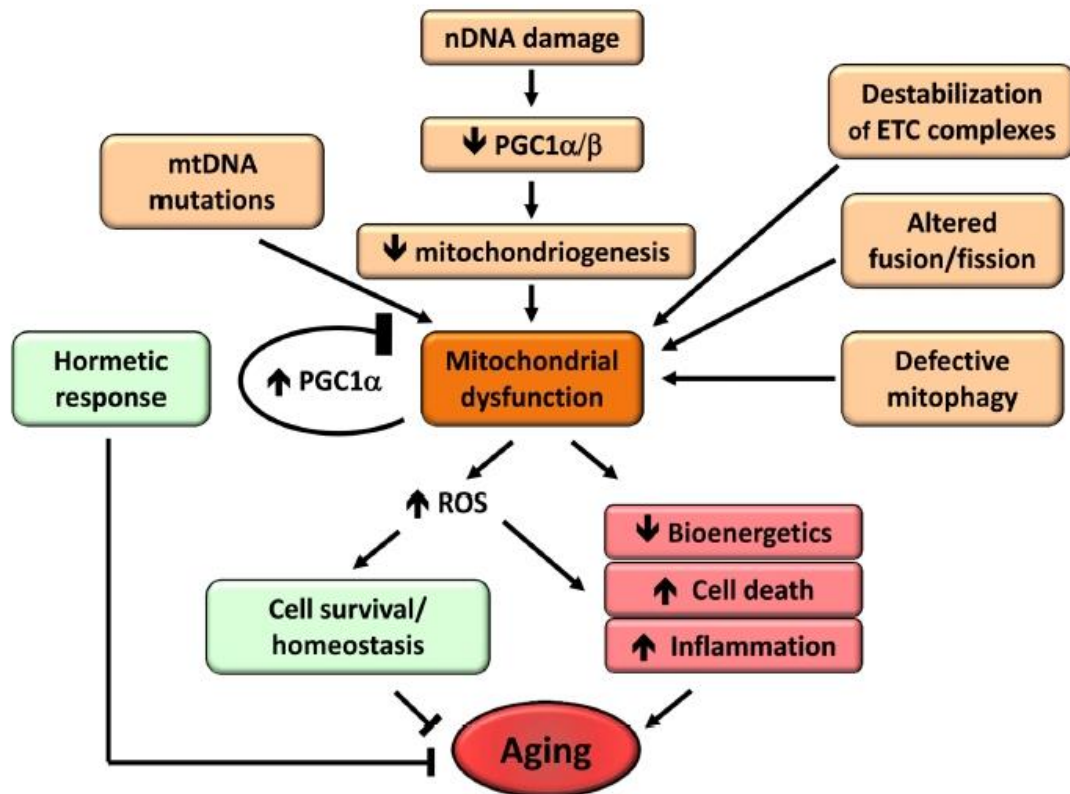


Figura 9. Esquema de la disfunción mitocondrial. Fuente: Green et al., 2011.

- h) **Senescencia celular:** La senescencia celular se puede definir como una detención estable del ciclo celular acoplado a cambios fenotípicos celulares (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007). Este fenómeno fue descrito originalmente por Hayflick en pasajes seriados de cultivos de fibroblastos humanos (Hayflick y Moorhead, 1961). Hoy en día sabemos que la senescencia observada por Hayflick es causada por el acortamiento de los telómeros (Bodnar et al., 1998), pero hay otros estímulos asociados del envejecimiento que desencadenan la senescencia, independientemente de este proceso telomérico. En particular, el

daño en el ADN no telomérico y la represión del locus INK4 / ARF, ambos producidos progresivamente con el envejecimiento, son también capaces de inducir senescencia (Collado et al., 2007). La acumulación de células senescentes en los tejidos envejecidos se ha inferido a menudo con marcadores alternativos como el daño en el ADN. Algunos estudios han utilizado directamente β -galactosidasa (SABG) para identificar senescencia en los tejidos (Dimri et al., 1995). Por ejemplo, en una cuantificación detallada de daños hepáticos, analizando SABG y los daños en el ADN, los resultados registrados fueron comparables, obteniéndose un total de aproximadamente un 8% de células senescentes en ratones jóvenes y un 17% en ratones de edad muy avanzada. Resultados similares se encontraron en la piel, pulmón y bazo, pero no se observaron cambios en el corazón, músculo esquelético y riñón (Wang et al., 2009). Basándose en estos datos, está claro que la senescencia celular no es una propiedad generalizada de todos los tejidos que envejecen de un organismo. Posiblemente, la acumulación de células senescentes con el envejecimiento puede reflejar un aumento en la tasa de generación de éstas y/o una disminución en su velocidad de eliminación, debido en parte a una respuesta inmune atenuada. Puesto que la cantidad de células senescentes aumenta con el envejecimiento, se ha asumido categóricamente que la senescencia celular contribuye al envejecimiento. Sin embargo, este punto de vista subestima lo que posiblemente es el propósito principal de la senescencia, que es la de prevenir la propagación de las células dañadas y la de desencadenar su desaparición por el sistema inmune. Por lo tanto, es posible que la senescencia sea una respuesta compensatoria beneficiosa que contribuye a eliminar los tejidos dañados de células potencialmente oncogénicas. Este punto de control celular, sin embargo, requiere un sistema eficiente de células de reemplazo que implique la eliminación de las células senescentes y la movilización de células progenitoras, para restablecer el número de células de un tejido. En animales viejos, este sistema es ineficaz y puede agotar la capacidad de regeneración de las células progenitoras con el tiempo, dando lugar a la acumulación de células senescentes que agravan los daños y contribuyen al envejecimiento (López Otín et al., 2013).

En los últimos años se ha apreciado que las células senescentes manifiestan alteraciones en sus secreciones, estando particularmente enriquecidas en

citoquinas pro-inflamatorias, y en metaloproteinasas de la matriz extracelular (Kuilman et al., 2010; Rodier y Campisi, 2011). Además de los daños en el ADN, otro problema asociado a la senescencia es la señalización mitogénica excesiva. Muchas de estas señalizaciones tienen un papel oncogénico, destacando $p16^{\text{INK4a}}/\text{Rb}$ y $p19^{\text{ARF}}/\text{p53}$ como las vías más importantes (Serrano et al., 1997). La relevancia de estas vías para el envejecimiento se vuelve aún más sorprendente cuando se considera que los niveles de $p16^{\text{INK4a}}$ (y en menor medida $p19^{\text{ARF}}$) se correlacionan con la edad cronológica de todos los tejidos analizados, tanto en ratones como en seres humanos (Krishnamurthy et al., 2004; Ressler et al., 2006). No hay conocimiento de ningún otro gen o proteína cuya expresión esté tan fuertemente correlacionada con el envejecimiento fisiológico, en todos los tejidos y a través de las especies. Su rango de variación es, en promedio, de un orden de magnitud entre los tejidos jóvenes y viejos. Recientes meta-análisis (más de 300 estudios) de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado el locus INK4a/ARF como el locus genómico que desde el punto de vista genético está mayormente vinculado a la mayoría de las patologías asociadas a la edad, incluyendo varios tipos de enfermedades cardiovasculares, diabetes, glaucoma o la enfermedad de Alzheimer (Jeck et al., 2012).

- i) **Comunicación Intercelular deteriorada:** Más allá de las alteraciones en las células individuales, el envejecimiento implica también cambios a niveles de la comunicación intercelular, ya sea a nivel endocrino, neuroendocrino o neuronal (Russell y Kahn, 2007; Laplante y Sabatini, 2012; Rando y Chang, 2012; Zhang et al., 2013). Por lo tanto, la señalización neuro-hormonal (como la de los sistemas renina-angiotensina, sistemas adrenérgico y el GH/IGF-1) tiende a desregularse en el envejecimiento. Además, las reacciones inflamatorias aumentan; la inmunovigilancia contra patógenos y células premalignas disminuye, y la composición de la matriz extracelular cambia el entorno, lo que afecta las propiedades mecánicas y funcionales de todos los tejidos. Una de estas modificaciones en la comunicación intercelular es la inflamación basal generalizada, es decir, un fenotipo proinflamatorio que acompaña al envejecimiento de los mamíferos (Salminen et al., 2012). Ésta puede deberse a múltiples causas, tales como, la acumulación de daño en el tejido proinflamatorio, el fracaso progresivo del sistema inmune frente a patógenos, la tendencia de las

células senescentes a secretar citoquinas pro-inflamatorias (véase la sección sobre senescencia celular), la mayor activación del factor de transcripción NF- κ B, o la respuesta defectuosa de autofagia (Salminen et al., 2012). Estas alteraciones dan lugar a una mayor activación de la inflamación que conduce a una mayor producción de IL-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF α) e interferón (Green et al., 2011; Salminen et al., 2012). La inflamación también está implicada en la patogénesis de la obesidad y diabetes tipo II (Barzilai et al., 2012). Del mismo modo, las respuestas inflamatorias defectuosas juegan un papel crítico en la aterosclerosis (Tabas, 2010). La reciente conclusión de que la inflamación asociada a la edad inhibe la función de las células madre epidérmicas (Doles et al., 2012) refuerza el papel de los procesos inflamatorios en el proceso de envejecimiento.

Más allá de la inflamación, los estudios indican que los cambios en el envejecimiento, relacionado con los tejidos, pueden conducir a un deterioro específico del fenotipo de los órganos. Además de las citoquinas inflamatorias, hay otros ejemplos de 'envejecimiento contagioso' en los que las células senescentes inducen senescencia a sus células vecinas, a través de brechas en las uniones tipo *gap*, y que implican a los ROS (Nelson et al., 2012). Y a la inversa, las manipulaciones de la longevidad en un sólo tejido pueden retrasar el proceso de envejecimiento en otros tejidos vecinos (Tomas-Loba et al., 2008; Durieux et al., 2011; Lavasani et al., 2012). Por ello, nos detendremos en realizar una pequeña introducción del envejecimiento en algunos tejidos concretos, y que es consecuencia de los factores que acabamos de describir.

2.1. Envejecimiento del sistema nervioso central

El tamaño del cerebro se reduce ligeramente y se pierden algunas neuronas en varias regiones del cerebro, tales como, el *locus coeruleus*, sustancia negra, hipocampo, núcleo caudado, putamen, y corteza cerebral (Fjell y Walhovd, 2010). Es bien conocido que la pérdida de algunas neuronas se acompaña también de un envejecimiento en el sistema neuroendocrino. Por ejemplo, la pérdida de neuronas en el hipotálamo tiene una influencia amplia en órganos endocrinos inferiores (Park y Yeo, 2013). Las neuronas del sistema nervioso están afectadas por el proceso de envejecimiento y ésta afectación la vemos reflejada, entre otras acciones, en la reducción de los niveles de sensibilidad de nuestros receptores sensoriales, la pérdida del potencial motor y la disminución del nivel cognitivo que habíamos alcanzado en la etapa de adultos. El grado de disminución de estas capacidades asociadas al sistema nervioso es muy variable y cada persona presenta unos niveles diferentes a las demás (Charchat-Fichman et al., 2005). Asimismo, los sistemas de compensación de estos deterioros son también muy diferentes en cada persona. Con el envejecimiento las neuronas pueden sufrir diversos cambios morfológicos que se observan, fundamentalmente, en el depósito de material de desecho en su citoplasma en forma de pigmento (lipofuscina), reducción del árbol dendrítico y del número de sinapsis que se establecen sobre cada neurona y de las que ella misma forma sobre otras neuronas (Crespo et al., 2006).

Probablemente la característica funcional más importante de la presencia de lipofuscina asociada al envejecimiento sea el hecho de que la mayor parte de los orgánulos citoplasmáticos degradados sean las mitocondrias. (Las mitocondrias son la fuente fundamental de ROS) (Harman, 1956).

La sinapsis interneuronal es el mecanismo morfológico por el cual una neurona presináptica libera un neurotransmisor al espacio sináptico que se une a un receptor que se encuentra en la membrana postsináptica de otra neurona vecina desencadenando una respuesta de activación o inhibición en ella. La disminución, durante el envejecimiento, del número de sinapsis o la reducción de su capacidad funcional por alteración en la síntesis, liberación y unión del neurotransmisor que se libera al espacio sináptico con el receptor postsináptico es una de las alteraciones más frecuentemente observadas en los cerebros de animales de laboratorio y en estudios de autopsias en humanos (Masliah et al., 1993). Generalmente las reducciones más importantes en el número de sinapsis se

producen en las neuronas de mayor tamaño y en aquellas que poseen los axones más largos (neuronas de proyección) mientras que las de menor tamaño y con axones cortos suelen estar menos afectadas. Este hecho explica que las enfermedades neurodegenerativas tengan su sustrato neuronal en neuronas piramidales de gran tamaño de la corteza e hipocampo (Enfermedad de Alzheimer) y la sustancia nigra (Enfermedad de Parkinson). El envejecimiento promueve la activación de diversas vías neuronales que inducen alteraciones en el equilibrio iónico y la reducción de los niveles energéticos en las sinapsis (Harris et al., 2003).

El neurotransmisor glutamato, es de tipo excitatorio y el más abundante en la corteza cerebral, activa los receptores específicos para glutamato en la membrana postsináptica (Mattson, 2008). Cuando se produce un incremento en el estrés oxidativo, por incremento de los ROS, se elevan los niveles de Ca^{2+} en la neurona postsináptica, lo que induce una cascada de reacciones moleculares que resultan en la muerte apoptótica de la neurona postsináptica (Raha y Robinson, 2001). Esto conduce al incremento de la excitotoxicidad por sobre-excitación neuronal (Isaac et al., 2007). Estas alteraciones del balance energético y alteración de la homeostasis pueden ocurrir tanto en la neurona presináptica como en la postsináptica durante el envejecimiento normal, y más exacerbadamente, en las enfermedades neurodegenerativas.

Durante el proceso de envejecimiento se puede producir una reducción en la capacidad de las neuronas para sintetizar los neurotransmisores que actúan en las sinapsis (Alvarez y Sabatini, 2007). Los neurotransmisores más utilizados son: el glutamato, GABA, acetilcolina y dopamina, y las alteraciones en los niveles homeostáticos de estos neurotransmisores ocasionan diferentes patologías que se ven incrementadas en el envejecimiento (VanGuilder et al., 2011). Así, la reducción en los niveles de acetilcolina es una de las características más notables en la enfermedad de Alzheimer (Schliebs & Arendt, 2011), y la disminución de la síntesis de dopamina es la característica típica de la enfermedad de Parkinson (Stoessl, 2001).

A lo largo del envejecimiento se disminuye aproximadamente un 20% en el flujo sanguíneo cerebral (Park y Yeo, 2013). En el cerebro se produce una reducción del volumen ocupado por los vasos sanguíneos y concretamente disminuye la superficie de los capilares que son el lugar de intercambio de gases de la respiración y moléculas para el trofismo neuronal (Fratiglioni et al., 2010). La barrera hematoencefálica (BHE) es el

lugar selectivo para el intercambio de nutrientes entre la sangre y el parénquima cerebral y, con el envejecimiento, los sistemas de transporte molecular que operan a este nivel se ven reducidos, con las consecuencias metabólicas que esto tiene para el normal funcionamiento del sistema nervioso (Grammas et al., 2011).

Uno de los aspectos menos conocidos es el papel que durante el envejecimiento cerebral juegan las células gliales (Mrak et al., 1997). Se ha demostrado tanto en animales de experimentación como en humanos que con el envejecimiento se produce una proliferación de astrocitos (gliosis reactiva) para paliar los efectos de la reducción de las neuronas que van degenerando a lo largo de la vida, de tal forma que aunque el número de neuronas se reduce durante el ciclo vital, el número de células de glía se incrementa como efecto compensatorio (Li et al., 2008). Además en diversas localizaciones del cerebro las células gliales adoptan conformaciones características asociadas al proceso de envejecimiento como ocurre en el hipotálamo que está constituido por neuronas que regulan la actividad endocrina de nuestro organismo (Crespo et al., 1994).

2.2.Envejecimiento del sistema cardiaco

Los cambios relacionados con el envejecimiento del corazón, por lo general, ocurren en las capas del miocardio. Las fibras de colágeno no suelen observarse en los cardiomiocitos de adultos normales, mientras que con el envejecimiento proliferan y se encuentran principalmente alrededor de los capilares de las capas del miocardio. Los cambios en el sistema cardiovascular son muy aparentes en las arterias y, en particular, en las paredes arteriales, las cuales se vuelven más gruesas y duras. Los patrones de glicosilación participan en el endurecimiento de las arterias. Debido a estos cambios anatómicos (que pueden incluir atrofia y aumento de tamaño) el corazón muestra a nivel funcional una disminución de la distensibilidad diastólica, así como aumento de la presión del pulso. Aunque en estado estacionario el gasto cardiaco se mantiene sin cambios, la frecuencia cardiaca máxima, el volumen sistólico máximo y el volumen de sangre circulante se reducen. Del mismo modo, cuando disminuye la sangre que entra en las arterias, se inhibe la actividad de los barorreceptores, lo que suele producir una hipotensión ortostática, muy común en los ancianos de avanzada edad (Park y Yeo, 2013).

2.3. Envejecimiento del hígado

En general, el volumen hepático se reduce entre un 20% - 40% en el envejecimiento, con una reducción más marcada en las mujeres (hasta un 44%) que en hombres (Schmucker, 2005). Microscópicamente, los hepatocitos envejecidos tienen un aumento en el número de cromosomas. Los hepatocitos muestran también una disminución en el número de mitocondrias, aunque el volumen de cada mitocondria aumenta individualmente (deterioro funcional de las mitocondrias); además poseen más lisosomas secundarios y acúmulos de lipofuscina con respecto a los hepatocitos jóvenes (Schmucker y Sachs, 2002). La acumulación de lipofuscina ha sido asociada con el estrés oxidativo crónico y con la incapacidad de degradar proteínas dañadas y desnaturalizadas (Jung et al., 2007). Por otra parte, la lipofuscina acumulada interfiere con varias vías celulares, debido a su capacidad para atrapar cationes metálicos y a que facilita aún más la formación de radicales libres (Jolly et al., 1995). Se estima que el flujo sanguíneo del hígado disminuye en un 35% - 50% en los ancianos, y puede ser responsable de las reducciones en el volumen hepático relacionadas con la edad (Wynne et al., 1989). Aunque se han observado diferencias interindividuales, las funciones hepáticas están relativamente preservadas en el envejecimiento normal.

2.4. Envejecimiento del músculo esquelético

El proceso de envejecimiento del músculo esquelético en el ser humano se asocia con una disminución significativa en la función neuromuscular y en la masa muscular (Doherty et al., 1993; Deschenes, 2004). La pérdida de masa muscular y la atrofia de fibras (especialmente las fibras musculares de tipo II) relacionada con la edad se conoce como sarcopenia (Deschenes, 2004). La sarcopenia incluye alteraciones en la inervación del sistema nervioso central y periférico, cambios en el estado hormonal, efectos inflamatorios, y disminución metabólica (descenso en la producción de ATP y de proteínas) (Doherty 2003). El declive relacionado con la edad en la masa muscular puede ser de hasta el 40%, entre los 25-80 años, contribuyendo a una pérdida global de fuerza muscular. La sarcopenia origina también una disminución del VO₂ máximo (es la cantidad máxima de oxígeno que el organismo puede absorber, transportar y consumir por unidad de tiempo) asociado con cambios en la capacidad pulmonar (función

respiratoria), el gasto cardiaco (Q), una menor irrigación y una peor extracción de oxígeno de la sangre (diferencia de oxígeno arterio-venosa). Esto lleva a una disminución de hasta un 20% del VO_2 máximo por década en adultos sedentarios (Ogawa et al., 1992; Shepard, 2003).

El ejercicio, especialmente el entrenamiento de resistencia, mejora la fuerza muscular de los mayores, contrarrestando los efectos de la sarcopenia (Frontera et al., 2000; Taaffe, 2006). En hombres de avanzada edad se ha demostrado un aumento del 11% de la masa muscular, después de 12 semanas de entrenamiento de resistencia (Frontera et al., 1988). Esto podría deberse a un aumento paulatino en el VO_2 máximo, el cual conllevaría a un aumento del flujo sanguíneo, producción de nuevas proteínas, ajustes metabólicos, etc (Evans 1997; Yarasheski, 2003). El ejercicio físico aumenta también el número de unidades motoras reclutadas para realizar una tarea dada, lo que les permite actuar con mayor sincronización e incrementar la capacidad de generar mayor fuerza muscular (Kamen y Gabriel, 2010).

2.5. Envejecimiento del sistema circulatorio

Hemos visto que uno de los mayores problemas asociados al envejecimiento de los diferentes órganos es la bajada drástica del flujo sanguíneo. El sistema vascular está muy relacionado con las alteraciones en la homeostasis celular que se produce en todos los órganos. La comprensión de los mecanismos subyacentes a las alteraciones fisiopatológicas vasculares inducidas por la edad, es primordial en el conocimiento de la mayoría de enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Estas alteraciones producen lo que se conoce como disfunción vascular (figura 10) y que es provocada por los cambios mencionados en el capítulo 2 de esta introducción:

Figura 10

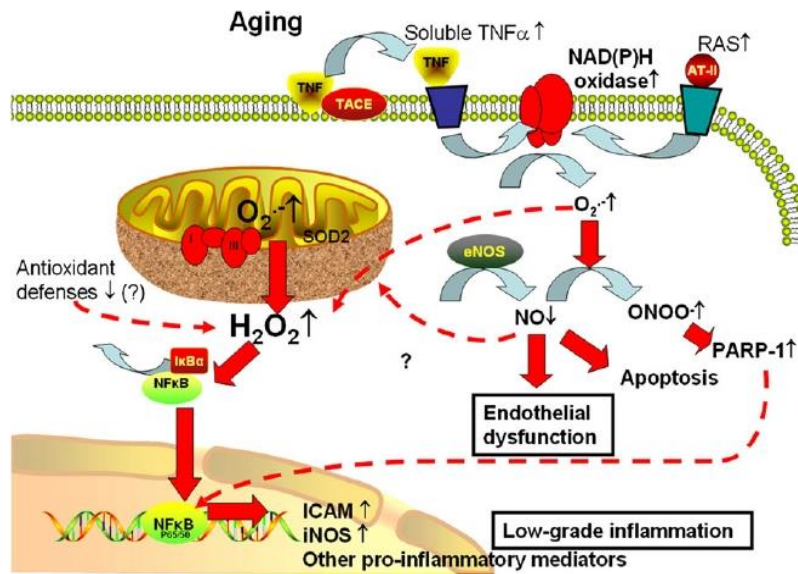


Figura 10. Mecanismos de envejecimiento vascular. Fuente: Ungvari et al., 2010.

a) **Aumento de los ROS:** Existen varias publicaciones que corroboran que un aumento en la producción de ROS, debido en parte a un aumento de la actividad de las NAD-(P)-H oxidasas (Csiszar et al., 2002; Donato et al., 2007), conduce a la disfunción endotelial que se observa en el envejecimiento, tanto en animales de laboratorio (Hamilton et al., 2001; Csiszar et al., 2007a; Ungvari et al. 2007) como en los seres humanos (Donato et al., 2007; Jablonsky et al., 2007). Se sabe también que el óxido nítrico (NO) es una molécula crucial para la salud y la función de las células endoteliales. En el envejecimiento, una de las consecuencias de un aumento del estrés oxidativo es la inactivación funcional del NO por altas concentraciones de O_2^- (Adler et al., 2003; Francia et al., 2004; Sun et al., 2004), lo que lleva a la disfunción vascular (Ungvari et al., 2008). En particular, el deterioro de la biodisponibilidad de NO, debido al estrés oxidativo, conduce a un deterioro grave del flujo sanguíneo en los senos vasculares (Sun et al., 2004), y a una peor vasodilatación, en respuesta a la demanda de oxígeno en los tejidos. La reducción severa en la biodisponibilidad de NO en el envejecimiento (Tchudi et al., 1996), está agravada también por un declive en la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Matsushita et al., 2001; Csiszar et al., 2002, Tanabe et al., 2003), por la reducción de la disponibilidad de tetrahidrobiopterina (Sindler et al., 2009) y por una disminución intracelular de la disponibilidad de L-Arginina.

b) Aumento de inflamación vascular: Cada vez hay más evidencias de que la inflamación basal asociada a la edad acelera la incidencia de enfermedades crónicas, incluyendo la aterosclerosis. Incluso en el envejecimiento normal y saludable, hay un cambio en el perfil de expresión vascular de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, según estudios realizados tanto en roedores de laboratorio como en primates (Csiszar et al., 2002; Ungvari et al. 2007, Wang et al., 2007; Pearson et al., 2008;). Las concentraciones plasmáticas de varios marcadores inflamatorios (por ejemplo, TNF α , VCAM-1, selectina-E, IL-6, IL-18 y MCP-1) se correlacionan positivamente con la edad, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular (Bruunsgaard et al., 2000; Miles et al., 2008). Los niveles elevados de citoquinas inflamatorias contribuyen a un microambiente que facilita tanto el desarrollo de disfunción vascular (Arenas et al., 2006; Csiszar et al., 2007b) como la apoptosis asociada al envejecimiento (Csiszar et al. 2004, 2007b).

c) Senescencia celular y deterioro del remplazo de células endoteliales: Las células, incluidas las endoteliales, están sujetas a la senescencia celular (inestabilidad genómica, telómeros disfuncionales...) influyendo ello en su ciclo celular. Además de las alteraciones relacionadas con la replicación celular, las células senescentes adquieren cambios fenotípicos (Coppe et al., 2008). Estos cambios están relacionados con la función paracrina de las células vecinas, al secretar mediadores que modifican el entorno de la matriz extracelular (como vimos en el capítulo 2.1). También hay una pérdida, relacionada con la edad, del remplazo celular por las células endoteliales progenitoras (CEP), mediada en parte por un desequilibrio entre factores de crecimiento angiogénicos, y factores de migración y de supervivencia celular. Por ejemplo, la síntesis de IGF-1 se atenúa en el envejecimiento, y probablemente lleve a la disminución de la estimulación y supervivencia de las CEP (Humpert et al., 2008). Otro ejemplo sería la caída observada en el envejecimiento de la expresión de otros factores, como VEGF o la endotelina, y de sus receptores.

3. Perspectiva actual del envejecimiento

Una visión global de las características del envejecimiento, enumeradas en esta tesis, permite agruparlas en tres categorías: características primarias, características antagonicas, y características integradoras (Figura 11).

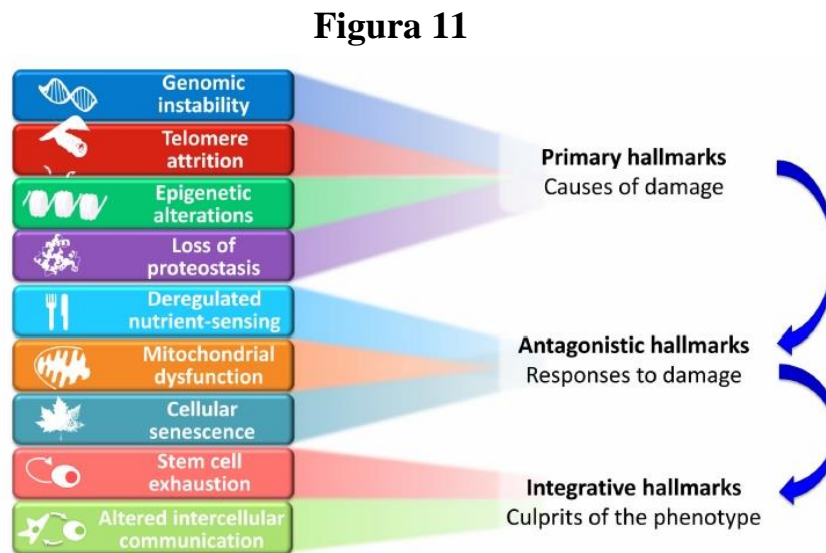


Figura 11. Agrupaciones de las características del envejecimiento. Fuente: López-Otín et al., 2013.

La característica común a todas es que son inequívocamente negativas. El daño en el ADN, incluyendo aneuploidías cromosómicas, mutaciones en el ADN mitocondrial, pérdida de los telómeros, cambios epigenéticos y proteostasis defectuosa, son ejemplos claros de lo dañino que es el envejecimiento. Otra de las características, común a todas, podría ser que los eventos dañinos se acumulan progresivamente con el tiempo. De este modo, las características antagonicas, siendo en principio beneficiosas, se vuelven progresivamente negativas en un proceso que está en parte promovido o acelerado por las características primarias. Así, las características antagonicas pueden tener efectos opuestos en función de su intensidad. A niveles bajos median efectos beneficiosos pero, a niveles altos, se convierten en perjudiciales. Este es el caso de la senescencia, la cual protege al organismo del cáncer, pero en exceso puede promover el envejecimiento. Del mismo modo, la producción de ROS media en la señalización celular para la supervivencia, pero a niveles altos y crónicos también resulta perjudicial.

Una tercera categoría comprende las características integradoras; frenar el agotamiento de células de remplazo y el deterioro de la comunicación intercelular

afectan directamente a la homeostasis y a la función de los tejidos. Cuando el daño acumulado, causado por las características primarias y antagónicas, no puede ser compensado por los mecanismos homeostáticos de los tejidos, se llega a la propiedad común del envejecimiento, antes nombrada, el *daño*. Debido a que las características que ocurren durante el envejecimiento están interconectadas, la comprensión exacta de cómo se interrelacionan supone un reto apasionante para futuros trabajos. Sin embargo, quedan aún muchos retos por delante, para la comprensión de este proceso biológico tan complejo que es el envejecimiento (Martin, 2011; Miller, 2012).

4. Intervención biogerontológica

Como hemos visto, el envejecimiento sigue siendo un misterio biológico considerable. La inmortalidad virtual de líneas celulares es claramente posible y, si toda la vida actual en la Tierra se originó a partir de un antepasado común (como lo demuestra el uso de un mismo código genético) ¿por qué envejecemos hasta morir y estas líneas celulares no? Además, existen organismos como la Hydra y algunas anémonas de mar que prácticamente no mueren con el paso del tiempo, por lo que en sí mismas son inmortales (Martínez, 1998). Los organismos se mantienen generalmente en un estado juvenil durante su desarrollo, y es sólo con el inicio de la reproducción que los efectos del envejecimiento empiezan a ser aparentes (Partridge, 2010). Sin embargo, no está claro cómo se inicia el proceso de envejecimiento, cuáles de los muchos fenotipos del envejecimiento son causa del deterioro funcional, y qué deterioros aumentan el riesgo de qué enfermedad.

El término intervención biogerontológica (IB) se refiere a cualquier intervención que mejore la salud durante el envejecimiento y aumente la esperanza de vida en múltiples organismos, incluyendo los mamíferos. Tiene como objetivo indagar en los procesos normales del envejecimiento y, por tanto, revelar los mecanismos fundamentales del mismo, así como encontrar posibles dianas para medicamentos que contribuyan en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

La restricción calórica (RC) consiste en una reducción en la ingesta de alimentos sin llegar a la malnutrición. Esta intervención aumenta la salud durante el envejecimiento en casi todos los organismos investigados hasta la fecha, incluyendo

primates y, posiblemente, seres humanos (Partridge, 2010). La RC no es una práctica regular, ni fácil de estudiar en los seres humanos, porque el cumplimiento de este régimen dietético riguroso es muy bajo. Sin embargo, trabajos recientes tanto en animales como en humanos, han sugerido que reducir la ingesta de ciertos nutrientes, particularmente aminoácidos específicos, puede ser más importante que la reducción de la ingesta de calorías, al conferir mayores beneficios para la salud (Solon-Biet et al., 2014). Además, como ya hemos visto, durante el envejecimiento pueden mejorarse los cambios en la señalización metabólica y endocrina, y con ello la salud (por ejemplo, con IGF-1). Otra IB se basa en la administración de rapamicina, que actúa inhibiendo mTOR, y aumenta la esperanza de vida desde levaduras a mamíferos.

Múltiples análisis han demostrado que las intervenciones enfocadas hacia una mejora/retraso del envejecimiento tendrán enormes beneficios para la salud (Goldman et al., 2013). Las intervenciones específicas para problemas específicos del envejecimiento son importantísimas, y seguirán siéndolo. Por último, es importante señalar que la comprensión de la fisiología y patología del envejecimiento permitirá evaluar la relevancia de los modelos animales para el estudio del envejecimiento humano (Partridge and David Gems, 2007). Los modelos animales de envejecimiento han demostrado que también existe la posibilidad de una medicina preventiva de amplio espectro para las enfermedades del envejecimiento (Figura 12).

Figura 12

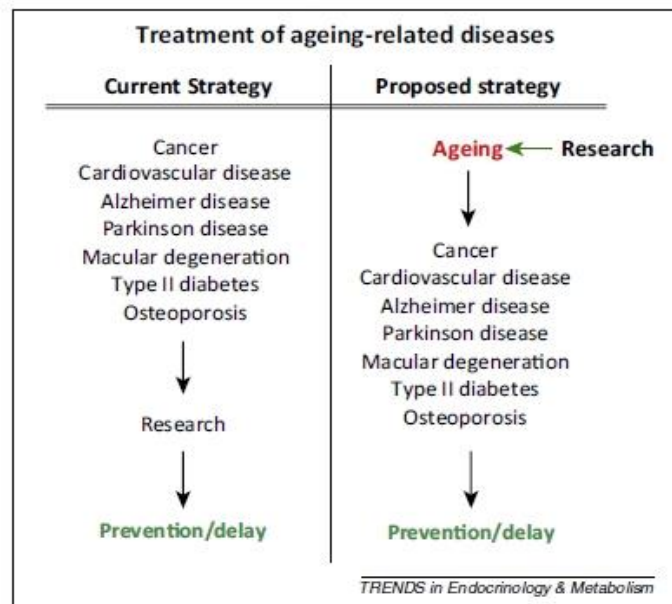


Figura 12. Estrategias actuales de investigación y estrategias propuestas. Fuente: Partridge, 2014.

La esperanza de vida es un rasgo determinado no sólo por factores ambientales (que debido a la inter-individualidad humana es prácticamente imposible de abordar) sino también, como ya hemos visto, por elementos genéticos. Esta teoría fue propuesta por Herskind (Herskind et al., 1996) al analizar 2.872 pares de gemelos de ambos sexos, y encontraron que las heredabilidades de la longevidad para los hombres y las mujeres son alrededor de 0,26 y 0,23, respectivamente. La contribución genética a la longevidad ha sido corroborada por algunos estudios recientes que han analizado la concordancia de la longevidad en gemelos monocigóticos y dicigóticos. Se estima que el 25-30% de la variación de la esperanza de vida es aportado por factores genéticos (Gudmundsson et al., 2000; Skytthe et al., 2003; Hjelmborg et al., 2006; Slagboom et al., 2011). A la luz de esto, y junto con el reconocimiento de rutas que regulan la esperanza de vida (incluidas las de mTOR y el IGF-1), actualmente se realiza la búsqueda de dianas moleculares para la longevidad. Uno de los primeros genes mutados que mostraron aumentar la longevidad fue AGE-1 (Friedman y Johnson, 1988). Su homólogo en mamíferos fue descubierto más tarde, la subunidad catalítica de la quinasa para 3-hidroxi-fosfatidilinositol (Morris et al., 1996). Otros ejemplos de genes relacionados con la longevidad incluyen AGTR1, SIR-2.1, HCF-1, SMK-1 y DAF-16 (Wolff et al., 2006; Rizki et al., 2011; Benigni et al., 2012). Algunos de estos genes han sido revisados extensamente en la literatura (Dali-Youcef et al., 2007; Landis y Murphy, 2010; Satoh et al., 2011).

En los últimos años, la exploración de genes de longevidad se ha intensificado gracias al empleo de la bioinformática y a los avances obtenidos en los perfiles de expresión génica, y perfil de expresión del genoma en los diferentes tejidos, incluyendo el cerebro (Hong et al., 2008), los músculos esqueléticos (Zahn et al., 2006) y los riñones (Rodwell et al., 2004). Esto proporciona datos valiosos que facilitan la generación de diversas hipótesis sobre la regulación transcripcional del envejecimiento. Ejemplos de dichos cambios, durante el envejecimiento, abarcan genes relacionados con los citocromos (Cyp1, Cyp4d21, Cyp4p3, Cyp6a9, Cyp6g1 y Cyp318a1), genes relacionados con el *turnover* proteico y las vías de ubiquitinación (CG2924, CG7220, crl, neur, Roc1b, Ubc84D y UBC-E2H), y los genes de respuesta a estrés oxidativo (GstS1, Jon65Ai, Jon65Aiv, Jon66Ci, Jon99Ci, Jon99Cii, mmd, Trxr-1, y TrxR-2). Estos genes son candidatos objetivos de mayores estudios para una posible prolongación de la longevidad.

Mediante el análisis de datos recogidos de 403 nonagenarios y 1670 controles de población joven (Deelen et al., 2011), descubrieron que el gen POT1 juega un papel importante en la asociación establecida entre el mantenimiento de los telómeros y la longevidad humana. También encontraron que el buen funcionamiento de la vía de señalización de IGF-1 estaba determinada en gran medida por los siguientes genes: Akt3, AKT1, FOXO4, IGF2, INS, PIK3CA, SGK, SGK2, YWHAG y POT1.

Con todo ello, el objetivo de mejorar la longevidad se está realizando desde tres enfoques diferentes: reducir en lo posible el proceso de envejecimiento a diferentes niveles, diagnóstico temprano de enfermedades asociadas al envejecimiento, y la cura de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Estos enfoques se contraponen con el tratamiento actual que consiste en aliviar los síntomas geriátricos, sólo cuando causan enfermedades. Sin embargo, los nuevos enfoques son más proactivos y, por lo tanto, más deseables. El esfuerzo biogerontológico se centra ahora en la identificación de genes candidatos, potencialmente vinculados con el envejecimiento y la longevidad (Swindell, 2007; Kim et al., 2012). Para estos estudios se utilizan modelos eucariotas simples (tales como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*) debido al alto coste y a la alta mortalidad de roedores y primates no humanos.

A pesar de la expectación generada por los esfuerzos de una IB, es importante no interpretar erróneamente, en el contexto del laboratorio, el éxito de la manipulación de la longevidad y los procesos de envejecimiento, como un triunfo final del desarrollo de la intervención en humanos. Como ejemplo, se ha determinado que la sobreexpresión del gen D-GADD45 aumenta la longevidad. El logro de tal atributo en las moscas de la fruta sólo se logró cruzando hembras UAS-D-GADD45 con machos GAL4-1407. Obviamente, esto es técnicamente imposible a la hora de plantear una IB en adultos viejos. Otro ejemplo puede ser tomado de Napoli (Napoli et al., 2003): descubrieron que la supresión del gen p66Shc puede proteger a los ratones, del estrés oxidativo a nivel de tejidos, de la apoptosis celular vascular y de la aterogénesis temprana. Aunque sean hallazgos alentadores, estos estudios se realizaron en modelos *knock-out* p66 (Shc^{-/-}), por lo que tampoco son reproducibles en viejos adultos.

El abismo entre la investigación básica y el desarrollo de una intervención molecular no sólo se circunscribe a la ejecución de la investigación sino también a la

estrategia de ingeniería genética. Por ejemplo, con el fin de hacer frente a la proliferación descontrolada de las células, y a su progresión subsiguiente en cáncer, la delección de la subunidad de los telómeros en todas las células (no germinales) para combatir dicha enfermedad resulta inviable. A nivel celular, el mantenimiento de los telómeros es imprescindible para una función normal durante el resto de la vida. Con la aparición de tecnologías como el ARN de interferencia (ARNi) y pequeños ARN de interferencia (ARNsi) ya no es un problema técnico inducir el silenciamiento génico a nivel celular; sin embargo, la introducción *in vivo* de moléculas de ARNsi en las células somáticas continúa siendo un gran obstáculo.

Otro ejemplo de IB se encuentra en la lucha contra los agregados de proteínas que se acumulan en los lisosomas (como la lipofuscina) y que aumentan con la edad. En la actualidad, la terapia de reemplazo enzimático (ERT) (Lachmann, 2011), la terapia de reducción de sustrato (SRT) (Cox, 2005) y la terapia génica (TG) *ex vivo* (Sands y Davidson, 2006) constituyen tres de las modalidades de tratamiento ampliamente estudiadas para los agregados lisosomales. Las enfermedades lisosomales se caracterizan por ser trastornos metabólicos genéticamente determinados, y por enzimas defectuosas lisosomales, con acumulación anormal de sustratos no degradados en dichos lisosomas. Sin embargo, la ERT y el SRT son estrategias terapéuticas paliativas y no curativas; mientras que la TG *ex vivo*, sólo se puede aplicar a tejidos en los que el trasplante de células sea viable.

Estas limitaciones han dificultado el potencial de estas estrategias para acometer enfermedades asociadas a la edad, como la acumulación de agregados lisosomales. En comparación con los métodos descritos, la TG somática puede aumentar directamente la maquinaria catabólica lisosomal, mediante la generación endógena persistente de la enzima deseada (Sands y Davidson, 2006). Esto ofrece una solución favorable a la acumulación de agregados lisosomales. Con los avances en ingeniería genética, la síntesis de plásmidos que codifiquen para una enzima ya no es un reto técnico, pero sí lo es introducir dichos plásmidos con éxito en células de cualquier organismo. La tecnología de transferencia de ácidos nucleicos (AN) ha jugado un papel importante en los últimos años, habiéndose estudiado su potencial terapéutico en varios modelos *in vivo*. Un ejemplo de este tipo de IB es la introducción vía cardíaca en cerdos con isquemia miocárdica crónica de un catéter que lleva un plásmido que codifica un factor de crecimiento hepático. Se logró preservar la perfusión microvascular en dicho

miocardio isquémico (Perin et al., 2011). Otro ejemplo se basa en la administración de plásmidos con ARNi en ratones con metástasis de pulmón (utilizando aerosoles con poli-etilenimina como vector). Con ello se inhibe el gen B16F10, y se reduce el número y tamaño de los focos tumorales, aumentando la supervivencia de estos ratones (Zamora-Avila et al., 2009). Todos estos experimentos han evidenciado la efectividad de algunas tecnologías de administración de AN en aplicaciones médicas. Esa efectividad se ha mejorado aún más, con la reciente aparición de tecnologías que integran estos AN en lugares específicos del genoma. Un ejemplo de esta tecnología es el sistema de integrasa Φ C31, el cual realiza la integración de plásmidos en sitios específicos del genoma humano y de ratón (Thyagarajan et al., 2001; Karow y Calos, 2011). Sin embargo, algunos estudios han planteado su preocupación por la seguridad clínica, al mostrar que la integrasa Φ C31 puede inducir daños en el ADN, y modificar el correcto reordenamientos de los cromosomas en células de mamíferos (Ehrhardt et al., 2006; Liu et al., 2009).

Estos avances, junto con el reciente desarrollo de sistemas de expresión génica inducible en los que se expresa el transgén de forma precisa y controlada, mediante el uso de compuestos bioactivos (Centlivre et al., 2010; Weyler y Morschhauser, 2012) u otros factores, tales como la radiación (Ito et al., 2001) o el calor (Tang et al., 2008), han abierto nuevas posibilidades para la terapia de AN.

Aunque se hayan producido estos avances, el “caballo de batalla” sigue siendo la transferibilidad del material genético en la IB. La transferencia de AN por vectores virales ha sido hasta ahora casi el único medio eficiente en la transfección sistémica, sin embargo, existen problemas por resolver, destacando sobre todo la patogenicidad e inmunogenicidad (Lai, 2011a). Estos problemas pueden no ser abrumadoramente devastadores en el tratamiento de la enfermedad, si se cumplen estos requisitos: el sitio patológico está bien localizado (como en los tumores primarios), siendo accesible para la administración local del vector viral, y la dosis viral requerida es mínima. Sin embargo, hemos visto que el envejecimiento es un proceso que afecta de manera sistémica, por lo que la mayoría de sus intervenciones requerirán la transfección en todo el organismo (De Grey et al., 2002). Esto significa esencialmente que la dosis viral tiene que ser alta, aumentando con ello los riesgos comentados anteriormente. Además, tal problema se agrava por la baja capacidad de carga de AN en el vector viral, debido al espacio físico restringido normalmente disponible en una cápsida viral, limitando con

ello la posibilidad de realizar una gran transferencia de AN terapéuticos, para abordar los múltiples cambios que ocurren en el envejecimiento.

Una alternativa a los vectores virales es el uso de vectores no virales para la transferencia de AN (Kircheis et al., 1999; Morille et al., 2008). Algunos de estos métodos han producido buenos resultados a nivel de laboratorio. Por ejemplo, mediante el uso de vehículos a base de nanopartículas de quitosano recubiertos de poli-isohexil-cianoacrilato, inyectado por vía intravenosa con RNAsi (anti-RhoA), se ha inhibido el crecimiento de tumores de mama en ratonas en un 90% (Pille et al., 2006). El uso de un dendrímero que contiene poli-amido-amina (G 4.0) como núcleo interno, y múltiples brazos circundantes con poli ácido-L-glutámico injertado en PEI, ha mostrado una gran capacidad de transfección (Zeng et al., 2011). A pesar de estos resultados prometedores, hay problemas relacionados con la corta persistencia de la expresión del transgén, y la baja eficiencia de transfección, en comparación con los vectores virales. Esto hace que de momento sea imposible aplicar estos métodos para una IB (Lai, 2011a, b).

Aparte de esto, hasta ahora la inyección intravenosa (IV) es el método más comúnmente utilizado para la administración sistémica. A medida que el vector es administrado, este se dirige de forma pasiva a los tejidos, llevando a cabo una transfección irregular (por ejemplo, en médula ósea, hígado y bazo mayor que en músculo esquelético o cerebro) (Lungwitz et al., 2005; Lai, 2011b). Esto puede resultar ventajoso, dependiendo del tipo de patología que se quiera tratar en el envejecimiento, como son los cánceres primarios. Pero cuando los enfoques biogerontológicos requieran la transferencia de AN a todas las células corporales, esto resulta inútil (además hay que contemplar todos los mecanismos de defensa del organismo, tanto extracelulares como intracelulares) (Nguyen et al., 2000; Ahn et al., 2002; Tang et al., 2003). Además de la inyección IV, se han realizado administraciones sistémicas de forma intranasal, bucal / sublingual, pulmonar, y transdérmica (Mathias y Hussain, 2010). Sin embargo, cada una de estas rutas tiene muchas desventajas potenciales.

Los avances de las tecnologías de transferencia de AN han de permitir una IB segura y eficaz, pero también para los tratamientos de otras patologías (Odom et al., 2007; Yannaki et al., 2010) y de trastornos congénitos (Sokolic et al., 2008; Hufnagel et al., 2012). Sin embargo, gran parte de la corriente en la investigación de transferencia de AN se ha dirigido a los tratamientos de enfermedades más manejables, y de tratamiento

más “sencillo” (incluyendo cánceres primarios) en el que la administración local de la terapia podría ser suficiente para obtener buenos resultados en el envejecimiento (Lai y Lin, 2009; Lai, 2011b). La necesidad de transferir material genético para una IB en todo el cuerpo, hace que la investigación actual sea complicadísima. La investigación básica es fundamental para avanzar en el conocimiento científico del envejecimiento biológico, pero sin descuidar los esfuerzos en convertir estos conocimientos adquiridos en una contribución por intentar innovaciones tecnológicas (Figura 13). Con el conocimiento de las tecnologías transgénicas y nuestra comprensión más profunda del envejecimiento, podrá darse un gran salto hacia la realización de una IB exitosa. Pero antes de esto, la ausencia de tecnologías eficientes de transferencia de AN aplicables a la IB será un gran obstáculo a superar. Sin embargo, la promesa de una terapia de transferencia de AN que retrase el envejecimiento fisiológico se hace más realista con publicaciones recientes como la de Bernardés de Jesús (Bernardés de Jesús et al., 2012). Estos investigadores administraron por vía IV a ratones adultos y viejos el serotipo 9 de un vector viral adenoasociado (AAV9) que codificaba el gen de la telomerasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Encontraron un aumento de la esperanza media de vida de ratones de 1 y 2 años de edad, de un 24% y 13%, respectivamente, sin que se incrementara el riesgo de cáncer. Se espera que una vez pueda superarse el obstáculo técnico de la transferencia de AN a todo el cuerpo, la perspectiva nueva de una IB de lugar a una prolongación de la longevidad y, con ello, de un envejecimiento saludable.

Figura 13

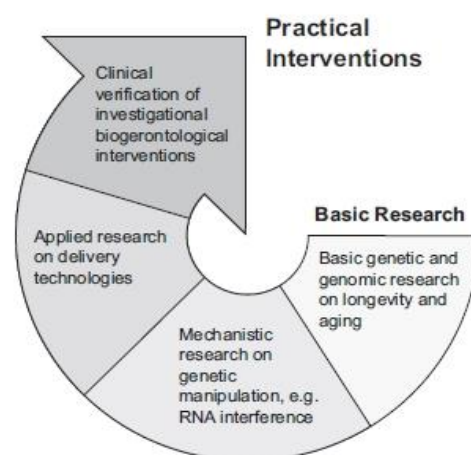


Figura 13. Etapas desde la investigación básica a la intervención práctica. Fuente: Lai, 2013.

5. Introducción a la Terapia Génica

La Terapia Génica es una estrategia terapéutica que se basa en modificar el patrimonio genético de determinadas células somáticas, mediante la administración de secuencias de AN, cuya finalidad es “curar” tanto enfermedades de origen hereditario como de tipo adquirido.

Hoy en día la terapia génica es más una promesa terapéutica que una realidad, aunque existen ya muchos ensayos clínicos con muy buenos resultados. En un futuro es posible que esta metodología revolucione la medicina ya que va de la mano de otras disciplinas y especialidades que avanzan de forma vertiginosa, como son la biología molecular, la biología celular, la virología, la genética, la bioquímica, la biofísica o las ciencias de la computación. La interdisciplinaridad será la clave para el desarrollo de la terapia génica.

Los elementos clave para desarrollar un protocolo de terapia génica son, fundamentalmente, los *vectores de transferencia* que portan el “gen terapéutico” y las células diana que son aquellas que van recibir el gen (Figura 14). Evidentemente, las cosas no son tan simples como parecen. Existen infinidad de inconvenientes, y dificultades experimentales y metodológicas, para optimizar tanto los vectores como las poblaciones celulares objeto de terapia génica, y que para una IB han de ser prácticamente la mayoría. Por si esto fuera poco, cada paciente como individuo poblacional responde como tal, de forma individualizada, y a veces radicalmente diferente a otro, aún padeciendo la misma patología y utilizándose el mismo protocolo establecido al efecto (como se ha mencionado, los factores ambientales e individuales producen una gran variación). Todo esto condiciona en gran medida los protocolos de terapia génica, especialmente en lo que respecta a la optimización de una buena relación beneficio/riesgo.

Figura 14

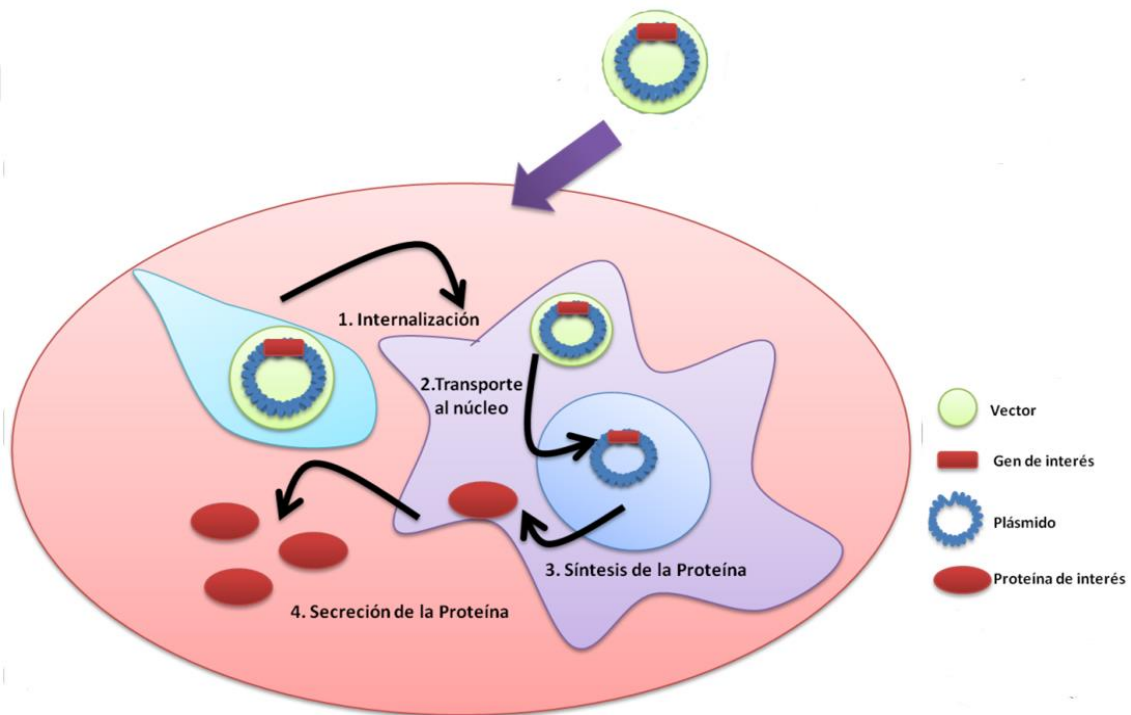


Figura 14. Esquema básico de la terapia génica.

5.1. Tipos de Terapia Génica

La transfección de una célula diana con un vector y la forma de llevarse a cabo la acción terapéutica del gen expresado, puede desarrollarse mediante: terapia génica *ex vivo* o terapia génica *in vivo*.

a) *Terapia Génica ex vivo*: Esta forma de terapia génica se basa en que previamente a la transfección con el vector, se extraen células del propio paciente procedentes de un tejido o de un órgano (Naldini, 2011). Posteriormente, y tras la disgregación del tejido y el mantenimiento del cultivo celular *in vitro*, se realiza la transfección de las células (generalmente seleccionadas como población homogénea) con el vector adecuado que porta el gen terapéutico. Entre los métodos de transfección son de utilidad, en este caso: los métodos no virales, y agentes químicos como el fosfato cálcico; los físicos como la electroporación, microinyección o bombardeo de partículas; los métodos de fusión mediante complejos ADN-liposomas y los métodos de endocitosis mediada por receptor, usando complejos ADN-proteína, ADN-cápsida viral o inmunoliposomas. Por supuesto, los vectores virales son

altamente eficaces como, por ejemplo, los retrovirus, los adenovirus y los adenoasociados. Las células así transfectadas se seleccionan por su capacidad de expresar el gen terapéutico de forma estable y persistente en el tiempo. Después de amplificarse, se reimplantan las células genéticamente modificadas en el propio paciente. Esta forma de terapia génica es sin duda la más segura para el paciente, pero como se mencionó en el capítulo anterior, es bastante “pobre” contra la mayoría de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

b) Terapia Génica in vivo: Esta forma de terapia génica se basa en la administración de forma sistémica al paciente de la construcción génica constituida por el vector y el gen terapéutico (Liras y Olmedillas, 2008). La forma de transfección se realiza, generalmente, mediante vectores virales, aunque se está ensayando con éxito la utilización de complejos ADN-liposomas, ADN desnudo o complejos ADN-proteína mediado por endocitosis de receptor. En ocasiones y en función de la patología a tratar, el vector puede ser o no dirigido. El vector dirigido es aquel que presenta tropismo específico de tejido, siendo de utilidad cuando la enfermedad tiene su origen en un determinado tejido, como puede ser un tumor localizado. En otros casos en que la “enfermedad” es sistémica, como ocurre en el envejecimiento, la única posibilidad es utilizar vectores no dirigidos sistémicos. Esta forma de terapia génica, aunque más eficaz en la distribución y expresión del gen terapéutico, puede conllevar más riesgos para el paciente, y que pueden ser irreversibles, ya que su administración es sistémica; a diferencia de la terapia génica *ex vivo* que permite retirar el implante o el injerto, pudiendo eliminarse de esa forma la fuente de distribución del vector.

5.2. Vectores de Terapia Génica

Los vectores son los que llevan a cabo el proceso de transferencia de un material génico a una célula, y los que aseguran su biodisponibilidad intracelular, para que éste ejerza una función biológica. Teniendo en cuenta que el papel de un vector es destinar, entregar y expresar un gen, el vector ideal sería aquel que reuniera las siguientes características: a) Una alta especificidad de destino celular a un órgano o tejido; b) Protección del ADN frente a degradaciones enzimáticas en su transporte hasta la célula; c) Facilidad para introducir el ADN en la célula y mantener una alta biodisponibilidad;

d) Alta eficacia de expresión del material genético; e) Baja inmunogenicidad; f) Ningún efecto secundario adverso grave ni moderado; g) Muy pocos efectos secundarios leves; h) Muy alta relación beneficio/riesgo para el paciente (Liras y Olmedillas, 2008). Esta situación ideal representa, evidentemente, el “caballo de batalla” de la terapia génica. Pero es el camino a seguir, con objeto de que esta tecnología llegue a ser totalmente eficaz y, sobre todo, pueda ser plenamente aceptada por la comunidad científica y la sociedad en general.

En terapia génica se utilizan actualmente una gran variedad de vectores que se clasifican, en general, en vectores virales y no virales (Lundstrom y Boulikas, 2003). Los vectores virales son virus modificados y “manipulados” para que, sin perder su capacidad infectiva, puedan introducirse en una célula sin producir patología. Conservan, por tanto, su capacidad para introducirse en la célula, y para dirigir y expresar un gen terapéutico exógeno (transgén). Por supuesto, presentan otras importantes desventajas que más adelante conoceremos. Los sistemas “no virales” no utilizan virus, sino otros sistemas que también se verán a continuación. Aunque los vectores no virales disponen de una menor eficiencia de transferencia génica que los vectores virales, los vectores no virales presentan una mayor seguridad para el paciente.

5.2.1. Vectores no virales

Los vectores no virales no utilizan virus para la transferencia de genes ya que el ADN se recubre mediante vesículas o elementos, en general, de carácter lipofílico. El sistema más habitual es el constituido por liposomas, de tal forma que la bicapa lipídica engloba al ADN, y facilita su transporte y paso a través de las membranas celulares. Además, a este sistema lipídico se le puede enlazar también determinadas moléculas/ligandos con objeto de que encuentren un receptor específico de membrana, lo que facilita enormemente su paso a través de la membrana de la célula diana. Aunque estos sistemas tienen la gran ventaja de su baja toxicidad y nula inmunogenicidad, presentan en contra una baja eficacia de transferencia y un menor tiempo de expresión del gen terapéutico (Conwell y Huang, 2005). Aun así, deberá tenerse en cuenta en determinadas patologías la consideración de lograr un equilibrio entre eficacia y tiempo de expresión génica, y la relación riesgo/beneficio, para los distintos tipos de vector. El complejo ADN-lípido es secuestrado y degradado en una gran proporción en los

endosomas, pero otra parte llega al núcleo donde, en forma episomal, dirige la expresión del gen terapéutico (Luo y Saltzman, 2000).

La tecnología farmacéutica ha acumulado experiencia en relación con los sistemas avanzados de administración de fármacos. En concreto, el desarrollo de sistemas sintéticos para la liberación controlada y la vectorización de fármacos ofrecen un fundamento básico al desarrollo de la terapia génica no viral. Estos sistemas incluyen: los lípidos catiónicos, los liposomas, agentes condensantes de diversa naturaleza, y vectores poliméricos a modo de nanopartículas y micropartículas (Pathak et al., 2009). La mayoría de los vectores no virales están basados bien en la encapsulación, o en la condensación del ácido nucleico en partículas, por interacción electrostática con los agentes condensantes (en general cargados positivamente), con el objeto de proteger al ADN de la degradación y facilitar su entrada en la célula. Para conseguir la transferencia de AN a la célula mediante un vector no viral, son necesarias una serie de etapas, que incluyen: la preparación del vector, la interacción con la membrana plasmática e internalización celular, el paso por el endosoma (en algunos casos), la migración a través del citoplasma, la entrada al núcleo, y la liberación del ácido nucleico. En la liberación de los ácidos nucleicos *in vivo* existen obstáculos adicionales que deben ser superados, entre los que se incluyen: barreras fisiológicas, interacciones inespecíficas con los fluidos biológicos, la matriz extracelular y las células no diana. Es necesario que el reconocimiento y la internalización en las células diana sean lo más específicos y, al mismo tiempo, debe evitarse en lo posible la transferencia no específica del gen y los efectos secundarios adversos. Conviene señalar que en la transferencia génica no viral habitualmente no existe integración del gen terapéutico en el genoma de la célula huésped. El ADN administrado suele permanecer en el núcleo como un episoma. Esta propiedad permitiría considerar a estos sistemas de terapia génica como si fuesen fármacos convencionales, en el sentido de poder determinarse la dosis necesaria en función del efecto deseado.

Los vectores no virales de terapia génica se componen de tres elementos (Rolland, 1998; Mahato et al., 1999): un gen que codifica la proteína terapéutica, un sistema de expresión basado en ADN plasmídico que controle tanto la función del gen dentro de la célula huésped como la secreción de la proteína terapéutica, y un sistema sintético de liberación que controle la distribución, liberación, reconocimiento e internalización del gen. En resumen, un plásmido y un vehículo adecuado. Aunque lo

más sencillo sería inyectar directamente el ácido nucleico (ADN “desnudo”) en el órgano de interés, este procedimiento es poco eficaz ya que el ADN se degrada rápidamente por la acción de las nucleasas celulares presentes en el suero sanguíneo. Con esta idea, los vectores no virales pueden clasificarse según su especificidad en:

- 1) *Vectores no virales inespecíficos*: Se denominan vectores no virales inespecíficos a aquellos que no poseen elementos cuya función esté orientada a liberar selectivamente en las células el ácido nucleico que transportan. La forma de interacción de estos vectores con la membrana celular es, por tanto, inespecífica. En principio, cualquier tipo de célula es susceptible de ser transfectada por un vector inespecífico, aunque existen diferencias en la eficacia de transfección que depende de factores como la naturaleza del tipo celular o su accesibilidad (Tros de Ilarduya, 2008). Podría ser este tipo el más idóneo para una IB.
- 2) *Vectores no virales específicos*: Estos vectores han sido diseñados con el objetivo de aumentar la eficiencia de transfección y añadir especificidad a la terapia génica. Están basados en su interacción con la superficie celular, a través de un mecanismo específico de internalización mediado por receptor, consistente en la incorporación de ligandos unidos a los vectores. Esta vehiculización específica se denomina “targeting”, término que literalmente significa “dianización” y que puede ser traducido como “direccionamiento”. El concepto de transferencia génica mediada por receptor está basado en los mecanismos de entrada utilizados por los virus y las toxinas, pero también en los empleados en la internalización de macromoléculas, incluyendo nutrientes (por ejemplo, LDL o transferrina) y factores de crecimiento y hormonas (insulina, VEGF, EGF o FGF). Los ligandos o “elementos direccionadores” pueden ser proteínas, péptidos, carbohidratos, vitaminas e incluso anticuerpos que reconocen específicamente un elemento de la superficie celular. Para la selección del elemento direccionador es necesario evaluar previamente la abundancia del receptor en las células diana, la especificidad, la afinidad del ligando, y si la interacción del ligando con el receptor de membrana es capaz de activar un proceso de internalización celular (Tros de Ilarduya, 2008). Un método que podría utilizarse en una IB sería aplicar varios vectores específicos, cada uno, siendo órgano dependiente. Claro está, ello sería una tarea ardua y muy tediosa.

Y según la naturaleza de su composición en:

1) *Vectores de base lipídica*: Los vectores de base lipídica (liposomas y lipoplejos) han resultado particularmente eficaces en la transferencia génica con plásmidos. La interacción electrostática entre el ADN, cargado negativamente, y las moléculas cargadas positivamente, hace que se formen unos complejos más o menos estables entre ambos materiales. Los liposomas son estructuras vesiculares formadas por una o varias bicapas fosfolipídicas, las cuales poseen uno o varios espacios acuosos en su interior. Los liposomas se caracterizan por tener una composición basada en lípidos aniónicos o neutros (Wong y Nicolau, 1980). El ácido nucleico suele estar encapsulado en los compartimentos acuosos internos de un liposoma esférico, ya sea éste mono o multilamelar. En este caso, la entrada a las células del ácido nucleico se produciría por fusión del liposoma con la membrana celular (liposomas neutros) o por endocitosis del liposoma (liposomas aniónicos) (Lee y Jeong, 2002). Los problemas en conseguir rendimientos aceptables de encapsulación del ácido nucleico, junto con la necesidad de separar los liposomas con el DNA encapsulado de las vesículas vacías, ha conducido al desarrollo de vectores basados en lípidos catiónicos. Estos vectores no presentan tales inconvenientes, por lo que la mayoría de la experimentación en terapia génica con vectores lipídicos se fundamenta en formulaciones con lípidos catiónicos. En general, para la preparación de liposomas se precisan, al menos, 5 etapas fundamentales: humidificación, dilatación, agitación para formar vesículas multilamelares, extrusión y homogenización/ sonicación. La lipofección mediada por liposomas se puede llevar a cabo de forma convencional por la fusión entre membranas lipídicas; mediante interacciones electrostáticas con liposomas catiónicos; de forma dirigida mediante ligandos conjugados que encuentran un receptor específico en la membrana de la célula diana, o bien por mecanismos aleatorios. En cualquier caso, el paso del lipocomplejo a través de la membrana celular está mediado por endosomas, y se precisa de un transporte activo para que el ADN alcance el núcleo. Se denominan lipoplejos (*lipoplexes*) a los complejos formados por un ácido nucleico y un lípido catiónico. La interacción electrostática del ácido nucleico con las cabezas polares catiónicas del lípido, tiene como resultado la formación de partículas, de formas y tamaños muy variables, dependiendo del tipo de lípido utilizado y del método de preparación. La carga

positiva del lípido, además de promover la formación espontánea de los complejos, facilita la interacción del complejo con la membrana plasmática (también cargada negativamente), probablemente mediante la interacción con proteoglicanos (Wiethoff y Smith, 2001).

2) *Vectores de naturaleza polimérica*: El complejo formado por el ADN plasmídico y los lípidos catiónicos es ineficaz para la transferencia génica en diversos órganos y tejidos, como es el caso del músculo esquelético. Por esta razón, se han desarrollado sistemas de transferencia génica no virales basados en la acomplejación del ADN con diferentes polímeros. Dentro de este tipo de vectores de naturaleza polimérica están los poliplejos, las micropartículas y las nanopartículas. El precursor de los actuales polímeros catiónicos fue el DEAE-dextrano, que ya en los años 70 se utilizaba como aditivo en la transferencia de genes con virus, porque en su presencia se incrementaba la infectividad viral. Prácticamente en todos los trabajos realizados con poliplejos en la década de los 90 se utilizaba la polilisina como reactivo de transfección. Sin embargo, en 1995 aparecen los polímeros catiónicos que se emplean actualmente en terapia génica, como son, la polietilenimina (PEI), los dendrímeros, los polimetacrilatos, los péptidos de cadena corta, y entre 1995 y 1997, el quitosano y los péptidos anfífilos. Actualmente existen polímeros catiónicos con buena capacidad para transfectar *in vitro*. Son proteínas, polipéptidos, poligluoaminas y polímeros sintéticos (Merdan et al., 2002). Dentro del grupo de polímeros sintéticos, cabe destacar la PEI. Se trata de un polímero catiónico de base nitrógeno-carbonada, constituido por unidades repetidas de monómeros de etilenimina que le confieren una alta solubilidad en agua y en la mayoría de los disolventes polares. La PEI tiene la densidad de carga más alta respecto a cualquier polímero orgánico conocido (20-25 miliequivalentes por gramo). Esta carga positiva la adquiere por protonación de los grupos amino. Esto implica que existe una correlación entre el pH y la densidad de carga positiva de la PEI. En comparación con la polilisina, la PEI presenta una capacidad tampón a cualquier rango de pH (Tang y Szoka, 1997). Es un polímero muy utilizado en la industria desde hace 30 años para la purificación de aguas, extracción de minerales, elaboración de champús, etc. Sin embargo, no sería utilizado hasta 1995 como vector de transfección. Entre las ventajas de la PEI, como vector en terapia génica, se encuentra su fácil asociación

con el ADN mediante interacciones electrostáticas, compactando el material genético en pequeñas partículas. Una vez formados los complejos PEI/ADN (poliplejos) la PEI evita la degradación del material genético, protegiéndolo de la acción de las nucleasas, a nivel intracelular (sistema de digestión endo-lisosomal) y extracelular (nucleasas séricas). Existe PEI ramificada de diferentes pesos moleculares, siendo las más utilizadas las de 25 y 800 kDa. El tamaño y peso molecular del polímero empleado influyen en la internalización del material genético y en su posterior expresión. Se ha observado que los complejos formados por la asociación de la PEI (800 kDa) con ADN y transferrina son potentes agentes de transfección *in vivo* e *in vitro* (Ogris et al., 2001). Sin embargo, esta PEI ramificada de alto peso molecular ha demostrado ser tóxica en ratones, al aplicarse por vía sistémica, en comparación con su análoga de bajo peso molecular (PEI de 25 kDa) que no muestra toxicidad *in vivo*; claro está, a costa de una menor eficiencia de transfección.

3) *Vectores de composición mixta*: Los vectores de composición mixta, también llamados “híbridos”, son aquellos en cuya formulación se incluye tanto lípidos como polímeros, y reciben el nombre de lipopoliplejos. Surgen de la posibilidad de combinar los poliplejos y los lipoplejos de tal manera, que se aumente la eficacia de transfección obtenida por separado con cada uno de ellos. Esta clase de vectores híbridos ha demostrado elevadas eficiencias de transfección *in vivo* tras su administración sistémica (Yotnda et al., 2002). Sin embargo, debido a su reciente incorporación, existen aún pocos experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* en los que se demuestre realmente sus grandes ventajas.

5.2.2. Vectores Virales

La necesidad de vectores responde a la presencia de obstáculos que se oponen al proceso de transgénesis. Estos obstáculos pueden estar presentes en el exterior de la célula. Por ejemplo, en el supuesto de que la transgénesis tenga lugar en el organismo, es decir, *in vivo*, la presencia de nucleasas en el medio extracelular haría inviable el uso del material genético desnudo. Una vez que éste ha alcanzado la célula diana se encuentra con la barrera fisiológica más inmediata, la membrana plasmática, que delimita lo que es el ámbito celular, impidiendo la entrada indiscriminada de material

externo al citoplasma celular. Existen maneras naturales y artificiales para conseguir que el material genético sobrepase esta barrera pero, desgraciadamente, está presente la siguiente “trampa” celular al material que consigue “colarse”: cuando el material genético entra en la célula por medio de invaginaciones de la membrana plasmática, los lisosomas se fusionan a la misma, y se forma el endosoma. Estas vesículas citoplasmáticas experimentan a lo largo del tiempo, y mediante su unión a otras vesículas endógenas, cambios en su contenido enzimático y en su pH, favoreciendo así la digestión del material genético incluido en ellas (Talavera et al., 1996; Russel, 1997).

Aun cuando el vector empleado sea capaz de eludir la acción de los lisosomas, el material genético debe entrar en el núcleo de la célula, ya que es en este compartimento celular donde se encuentra la maquinaria enzimática que permita llevar a cabo la expresión de los genes aportados. Para lograr esto, se debe atravesar la última de las barreras físicas, la envuelta nuclear que, en general, sólo deja paso libre a moléculas muy pequeñas o que posean un mecanismo específico de transporte a través de los poros nucleares presentes en dicha envuelta (Talavera, 2008).

Es obvio, pues, que el diseño de cualquier vector de transgénesis ha de tener en cuenta la necesidad de sobrepasar todos estos obstáculos. La naturaleza ofrece muchos mecanismos de evasión de estas barreras, en el ciclo biológico de los diferentes tipos de virus. En efecto, al ser estos microorganismos parásitos celulares obligados, han tenido en su evolución que optimizar los mecanismos necesarios para que su material genético sea expresado en el interior de la célula y, en su inmensa mayoría, en el núcleo. Es por esto que los primeros vectores de transgénesis que se diseñaron se basaron en la modificación de diferentes virus, recibiendo este tipo de vectores la denominación genérica de *vectores virales* (Talavera y Sánchez, 2004). Se puede decir que, en general, los vectores virales garantizan la evasión de todos los obstáculos anteriormente enumerados.

Desde que comenzaron a utilizarse los vectores virales, alrededor de los 80, hubo una gran competencia entre vectores adenovirales y retrovirales. Sin embargo, en estos últimos años han irrumpido con mucha fuerza los vectores virales adenoasociados, los cuales se describirán más adelante.

5.2.2.1. Vectores adenovirales

Los vectores adenovirales basan su existencia en los adenovirus (Roy-Chowdhury y Horwitz, 2002; Alba et al. 2005). Son virus respiratorios aislados por primera vez en 1953 por Rowe del tejido adenoidal nasofaríngeo humano. Tienen forma regular icosaédrica, sin envuelta, de 120 nm de diámetro, cuya cápsida está compuesta por 252 capsómeros. Doce de dichas subunidades tienen simetría pentámera (pentones) y se colocan en los 12 vértices del icosaedro; de su base pentónica emerge una fibra que tiene un papel importante en el proceso de entrada del virus en la célula huésped. Las caras del icosaedro están formadas por 20 grupos de 12 subunidades hexónicas (de simetría hexámera). A todas estas proteínas principales se agregan otras secundarias que estabilizan la partícula viral. En el interior de la partícula se encuentra el material genético, consistente en un ADN bicatenario de 36 Kb, que codifica unas 2700 proteínas virales. Los genes correspondientes a dichas proteínas se distribuyen en grupos, 4 de ellos (E1 a E4) de expresión temprana (antes de la replicación del genoma viral), y 5 (L1 a L5) de expresión tardía, una vez replicado el ADN. Las zonas terminales muestran que entre los nucleótidos 0 y 103 existe una zona llamada de “repetición terminal invertida” o ITR, cuyo nombre obedece a que en el otro extremo de cada cadena está presente la secuencia complementaria. Entre los nucleótidos 194 y 380 aparecen secuencias necesarias para que los ADNs virales sean empaquetados en cápsidas durante el proceso de ensamblaje de los virus progenie. La entrada del virus tiene lugar mediante la unión de las fibras a receptores específicos de la membrana plasmática, seguida de la invaginación de ésta, con lo que el virus entrante queda englobado en un endosoma que logra romper antes de entrar en la vía lisosomal. Una vez en el citoplasma el virus entra en el núcleo, donde pierde la cápsida y comienza la expresión de los genes tempranos necesaria tanto para la replicación del ADN como para la expresión de los genes tardíos. Muchos de estos genes codifican las proteínas virales que se ensamblan, una vez encapsidado el ADN recién replicado, para producir las partículas virales correspondientes a la progenie.

Ciertas características de los adenovirus, tales como: el gran tamaño de su genoma, capaz de albergar transgenes de gran longitud, la presencia extracromosómica de su ADN (episomal) en el núcleo de la célula, así como el conocimiento de numerosos serotipos de adenovirus humanos, hicieron que estos virus fueran contemplados como fuente de vectores de transgénesis para terapia génica (Segura et

al., 2008; Crystal, 2014). En una primera generación de vectores adenovirales, el transgén era insertado en un plásmido que contenía la región del extremo izquierdo del ADN viral, precisamente en el sitio del gen temprano E1. Este plásmido se introducía mediante electroporación en una estirpe celular humana que expresaba constitutivamente dicho gen E1, junto con la mayoría del extremo derecho del ADN viral. De esta manera, ambas zonas virales, la contenida en el plásmido y portadora del transgén, y la que contenía el extremo derecho, estaban solapadas. La presencia de la zona de solapamiento permitía que se generase, mediante recombinación homóloga, un ADN viral de longitud completa y portador del transgén. La expresión en la célula de todos los genes virales permitía la formación de partículas de adenovirus, capaces de transducir el transgén (Talavera, 2008).

Estos primeros vectores provocaban una reacción inmune, debido a que la inactivación de E1 no abolía completamente la expresión de los genes tardíos en las células transducidas. Tras una segunda generación de virus en la que se trató de inactivar otros genes tempranos (con poco éxito) se diseñaron nuevos vectores. Para ello, se abolieron todos los genes estructurales del ADN viral, dejando sólo las zonas necesarias para la replicación y encapsidación del ADN. Los vectores de tercera generación o vectores vacíos (Gonçalves, 2005) necesitan para su formación, técnicas de ingeniería genética adicionales relativas a la expresión (en las células empaquetadoras), de genes virales que aunque son capaces de dar lugar a las proteínas de la cápsida se encuentran inhabilitados para su encapsidación.

5.2.2.2. Vectores basados en virus herpes

Los herpes virus constituyen un grupo de virus con ADN bicatenario, de unos 1500 pares de bases, dividido en dos secciones (UL y US) de distinto tamaño, y flanqueadas por sendas repeticiones terminales invertidas. Ambas secciones pueden disponerse de forma directa o invertida, una con respecto a la otra. La partícula consiste en una cápsida icosaédrica rodeada de un tegumento (adquirido en el paso del virus por el aparato de Golgi en su camino de salida de la célula) y que a su vez se rodea de una envuelta viral (Talavera, 2008).

El genoma de los virus herpes de tipo 1 contiene unos 75 genes, de los cuales, aproximadamente 35 son esenciales para el ciclo viral. El resto del genoma lo constituyen genes accesorios, en el sentido de que su inactivación no afecta a la infectividad del virus, por lo que pueden ser sustituidos por genes celulares. Destaca la presencia de la zona LAT, responsable del estado de latencia que alcanza el virus durante largos períodos.

La infección por virus herpes tiene lugar en células epiteliales. Los virus originados en esta infección primaria son los que alcanzan las terminaciones nerviosas sensoriales (Borenstein et al., 2004). Después de ser transportados vía axonal hasta el núcleo neuronal pueden entrar en estado latente, merced a la acción de los genes de la zona LAT, permaneciendo así en forma extracromosómica hasta que algún tipo de estímulo (inmunosupresión, estrés, fiebre, ciertas enfermedades) reactive la fase lítica. Al final de ésta, los viriones emergen del núcleo y son transportados por el axón hasta la terminación nerviosa, donde tiene lugar una nueva infección aparente (y recurrente) cerca del sitio de la infección primaria. La capacidad de los herpes virus para infectar neuronas, ha determinado el desarrollo de los correspondientes vectores de terapia génica (Talavera et al., 2000). Los vectores de herpes virus pueden tener un gran impacto en terapia génica de enfermedades del sistema nervioso central y periférico, de tumores, e incluso, del dolor crónico.

5.2.2.3. Vectores retrovirales y derivados

La Familia *Retroviridae* se clasifica actualmente en 7 géneros cinco de los cuales se engloban, por su capacidad de producir tumores sólidos o leucemias, en un grupo que recibe el nombre de *Oncoretrovirus*. A éstos se suman el género *Lentivirus*, llamado así por el curso lento de su infección, y el género *Espumavirus*, nombre que obedece al aspecto vacuolado de las células infectadas por este tipo de virus que, por otra parte, no producen ningún tipo de patología aparente. Los retrovirus son virus con envuelta, de unos 100 nm de diámetro. En el interior se encuentra la nucleocápsida que contiene el material genético acomplejado con proteínas. La envuelta contiene proteínas específicas de origen viral, las cuales se unen al receptor celular en el momento de la

infección, y otras proteínas de origen celular que permanecen al emerger, por gemación, la partícula viral de la célula (Talavera, 2008).

El material genético contenido en las partículas retrovirales está constituido por dos moléculas de RNA. El genoma del virus permanece en la célula infectada como un ADN integrado en el ADN celular, desde donde se expresan los genes virales para dar lugar a los virus progenie. Esta paradoja es debida a que tras la entrada de los virus en la célula, proceso que necesita al menos dos componentes de la superficie celular (receptor y correceptor) el RNA unicitenario viral, con el concurso de la enzima transcriptasa inversa (RT) contenida en el virus, se transforma en un ADN bicatenario. Esto ocurre mediante un complejo proceso de síntesis en el que la molécula de ARN, aunque lineal, se comporta como si sus extremos estuviesen unidos, es decir, como una circunferencia virtual. Ambas cadenas de ADN, negativa (-) y positiva (+) comienzan su síntesis en lugares precisos del genoma y la cadena (-) se copia directamente del ARN viral, utilizando como cebador un ARNt celular. La cadena (+) es una copia de la cadena (-) y utiliza como cebador un resto del ARN viral que ha ido degradándose en el proceso de copia. En el ADN bicatenario están presentes todas las secuencias del ARN, algunas de las cuales se repiten en disposición directa a ambos lados de la nueva molécula, constituyendo las estructuras llamadas “repeticiones terminales largas” o LTRs. Este ADN no sólo ha de tener acceso al núcleo para poder expresar sus genes sino que, además, ha de integrarse en la cromatina nuclear. Para este fin, otra enzima del virus, la integrasa (IN), acompaña al ADN desde el momento de su síntesis y se encarga de cortar el ADN celular en determinados lugares. El lugar preferente de corte depende de la especie viral, con el fin de acoplar a dicho corte el empalme del ADN viral que queda entonces en estado de provirus. Todos los retrovirus, sin excepción, contienen tres genes principales “canónicos” que codifican: las proteínas estructurales de la cápsida (gen *gag*), las enzimas RT e IN (gen *pol*), y las proteínas virales de la envuelta (gen *env*). Estos genes se expresan a partir del provirus mediante la maquinaria de transcripción celular, y a partir de un promotor que se encuentra en los LTRs. Sólomente el LTR izquierdo es operativo para el provirus; el contenido en el LTR derecho es tan sólo un vestigio del pasado del ARN de la molécula pero, una vez insertado el provirus, puede activar otros genes que queden adyacentes a él (Saenz y Poeschla, 2004). El retrovirus más conocido hoy en día es el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH),

agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida o SIDA (Talavera et al., 2000).

Anteriormente el modelo de retrovirus correspondía al virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), a partir del cual se diseñaron los vectores virales de terapia génica más usados en experimentación y en la clínica durante muchos años. La preparación de dichos vectores ha seguido pautas diversas, todas ellas necesitadas de un elemento central, el plásmido llamado “vector retroviral genómico”, que incluye un provirus en el que los 3 genes estructurales han sido eliminados y sustituidos por el transgén.

En este vector plasmídico se conservan las demás regiones no codificantes, entre las que se incluyen no sólo los LTR sino también otras secuencias necesarias para el correcto funcionamiento de la transcripción reversa, para la encapsidación del ARN (zona Ψ). Esta construcción se introduce en una célula empaquetadora junto con otros plásmidos que aportan los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*. Cuando estos genes se expresan, forman partículas virales en las que exclusivamente se encapsida el ARN procedente del vector retroviral genómico, ya que los otros plásmidos no poseen ninguna región de empaquetamiento.

Un inconveniente que presentan los vectores derivados del MoMLV es que son incapaces de transducir células que se hallan en estado de reposo. Ello es debido a que el ADN viral, cuya síntesis tiene lugar en el citoplasma, no posee mecanismos específicos de entrada en el núcleo. Ha de esperar entonces a que la célula infectada entre en mitosis (momento en el que se desintegra la envuelta del núcleo) para entrar en contacto directo con el material nuclear. Una situación diferente la ofrecen los *Lentivirus* y, por lo tanto, los vectores basados en su ciclo biológico (Saenz y Poeschla, 2004). Los virus de este género poseen en el ADN recién sintetizado una característica que no se encuentra en los *Oncoretrovirus*: hacia su parte media existe una zona de 88 nucleótidos en la que una de las cadenas de ADN está representada dos veces, con lo que dicha zona actúa como una triple hélice.

Esto es así porque la cadena de ADN (+) se sintetiza a partir de dos orígenes de replicación, en lugar de hacerlo a partir de uno sólo, como sucede en los *Oncoretrovirus*. Además, el ADN sintetizado a partir del primer origen (principal) continúa su elongación por encima del origen secundario hasta que, 88 nucleótidos más

adelante, encuentra una señal de terminación, lo que determina el solapamiento señalado. Esta estructura facilita el plegamiento del ADN y su acomplejamiento con proteínas que facilitan su paso a través de los poros nucleares (Connolly, 2002; Van Maele et al., 2003). La preparación de vectores basados en *lentivirus* requiere conocer otras características diferenciales de este grupo (Lever et al., 2004; Sinn et al., 2005). A pesar de que el VIH ha representado, y todavía continúa siendo, un peligro epidemiológico desde el punto de vista sanitario y de Salud Pública, este virus patógeno ha sido, a pesar de todo, el primer *lentivirus* empleado en el diseño de este tipo de vectores.

En los últimos años, el desarrollo de los vectores lentivirales ha permitido aplicaciones de terapia génica en tejidos cuyas células no se encuentran normalmente en división (Janas et al., 2006). Este es el caso de muchas células del sistema nervioso (Dowd et al., 2005; Jakobsson y Lundber, 2006), en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer (Brito-Armas et al., 2013). También en los islotes de Langerhans, con el fin de detener el progreso de destrucción de las células beta, causa principal de la diabetes de tipo I (Kobayashi et al., 2004; Kobinger et al., 2004). Otro tejido candidato es el muscular, en el caso de la distrofia muscular (Li et al., 2005) o las células madres hematopoyéticas, en la hemofilia (Kootstra et al., 2003) o en la anemia de Fanconi (Yamada et al., 2003). Se ha estudiado además la posible aplicación de los vectores lentivirales en la terapia génica del cáncer (Pellinen et al., 2004; Painter et al., 2005), por ser especialmente idóneos en la inmunoterapia mediada por células dendríticas (Dullaers y Thielemans, 2006).

5.2.2.4. Vectores Adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) humanos fueron descubiertos en 1965 como un contaminante de las preparaciones de adenovirus. Los AAV son icosaédricos sin envuelta, de 18-26 nm de diámetro, pertenecen al género *Dependovirus*, dentro de la familia *Parvoviridae*, cuyo nombre se refiere al pequeño tamaño de las partículas (Myers et al., 1980). Su simplicidad genética determina que cuando infectan una célula la infección no sea productiva de nuevos virus, a menos que la misma célula sea infectada (en ese momento o en otro posterior) por otro virus más poderoso genéticamente. Este virus dispone de las funciones de las que el parvovirus carece y,

generalmente, es un adenovirus (de ahí el nombre de adenoasociados). Tras el establecimiento en 1982 de los primeros clones infecciosos de AAV2, este virus ha ido ganando 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 (Talavera, 2008).

Los serotipos de AAV comparten una estructura genómica común, consistente en un ADN de cadena simple de 4680 nucleótidos, con ITRs de 145 nucleótidos. Este genoma contiene tan sólo 3 fases abiertas de lectura que, comenzando en tres promotores diferentes, solapan entre sí, y dan lugar a 7 proteínas; ya que cada uno de los 3 ARNs mensajeros puede sufrir, o no, procesos de corte y ligamiento (*splicing*) diferentes. En ausencia del virus auxiliar, los virus adenoasociados pueden integrar su genoma en sitios determinados del genoma celular, de donde son rescatados cuando tiene lugar la infección por el virus auxiliar. Esta presunta capacidad de integración específica se cita comúnmente como una de las ventajas de estos virus para la preparación de vectores (Mingozzi y High, 2007; Nagara et al., 2004). Pero en la mayoría de los casos dicha especificidad resulta abolida como consecuencia del proceso de vectorización. La preparación de virus adenoasociados portadores de un transgén (Borenstein et al., 2004) requiere disponer de un genoma viral clonado en el que todas las secuencias del genoma viral, excepto las ITR y las zonas no codificantes adyacentes a éstas, hayan sido sustituidas por el transgén. Esta construcción se introduce en las células junto con otros dos plásmidos portadores de los genes auxiliares del adenovirus y de los genes estructurales del virus adenoasociado, respectivamente, y que, como en el caso anterior, han sido inhabilitados para su encapsidación. El único ADN empaquetado en las partículas virales formadas por la célula así tratada, será el que corresponde a los virus adenoasociados recombinantes. El principal inconveniente de este tipo de vectores es, dado su pequeño tamaño, la imposibilidad de transducir genes de tamaño superior a 5 Kb. Aunque a veces se ha recurrido a trucos basados en señales de *splicing* o de recombinación homóloga, para que dos mitades de un transgén, cada una de ellas aportada por un adenoasociado diferente, se combinen en el interior de la célula (Brito-Armas et al., 2011).

Los diferentes serotipos muestran variación en el tropismo celular y de tejidos, debido a diferencias en las proteínas de su cápsida. Ello implica 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 sulfato de heparina (HSPG) como a uno de sus receptores principales (Summerford y Samulski, 1998). La unión a un receptor no es un estímulo suficiente para la internalización viral, la cual, necesita además correceptores, tales como heterodímeros de integrina, receptor de factor de crecimiento fibroblástico tipo 1 y el receptor de factor de crecimiento de hepatocito, c-Met (Dos Santos y Beyer-Nardi, 2008). El HSPG presenta una distribución ubicua en células y tejidos de varias especies. Esto explica en parte el amplio tropismo de AAV2 en células, humanas, de primates no humanos, caninas, murinas y de aves, por lo que resulta un candidato excelente para una IB. 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 (Di Pascuale et al., 2003). Los diferentes serotipos de AAV transducen preferentemente diferentes tipos celulares. En general, el tropismo está asociado con la abundancia de receptores/correceptores específicos, aunque hay excepciones (Duan et al., 2000). Esto sugiere que probablemente hay otras vías de internalización que son independientes de receptores conocidos (Din et al., 2005).

Hasta ahora se han identificado numerosos serotipos de AAV, con un tropismo variable. El nivel de homología de aminoácidos en la proteína de la cápsida de los serotipos 1 a 9 es aproximadamente un 45% (Chiorini et al., 1999; Gao et al., 2002), siendo los serotipos más divergentes los AAV4 y AAV5. Ha habido numerosos estudios en los que se ha realizado evaluaciones relativas del tropismo de diferentes serotipos de AAV. En el cerebro se ha empleado los serotipos 1, 2 y 5 (Burger et al., 2004), 7-9 y rh10 (un serotipo de primates), 1, 2, 5, 7 y 8 (Taymans et al., 2007) y 2, 5, 8 y rh10 (Sondhi et al., 2007), 8, 9, rh10 y rh43 (Klein et al., 2008). Una limitación importante de los estudios previos era que la falta de uniformidad, tanto en el diseño de los plásmidos, como en la producción, purificación, y ruta de administración, hacía difícil la comparación de las eficiencias de transducción de estos serotipos en los diferentes tejidos. Con objeto de poder 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. Para estudios de tropismo se ha empleado genes reporteros 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 (Lipshutz et al 2001; Wu et al., 2001). Consecuentemente, las diferencias encontradas en las eficiencias de transducción y en los perfiles de biodistribución, serán reflejo exclusivamente de las diferencias en las cápsidas de los viriones de estos serotipos.

Recientemente se ha estudiado el tropismo y cinética de expresión en 9 serotipos diferentes de AAV, los cuales han sido empaquetados, producidos, purificados e inyectados por la misma ruta sistémica (Zincarelli et al., 2008). 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 de la expresión del transgén en ratones, durante 100 días, y también 9 meses después de la administración intravenosa de los serotipos AAV 1-9. Estos serotipos expresaban el transgén luciferasa (controlado por un promotor/activador temprano de CMV y flanqueado por secuencias ITRs de AAV2) (Zincarelli et al., 2008).

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 pertenecían al grupo de expresión moderada, y c) AAV7 y 9 correspondían al grupo de expresión elevada. Entre estos serotipos, hubo una gran variación en la cinética de expresión, 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 los órganos diana primarios para los serotipos 1, 2, 5, 6, 7 y 9 son el hígado y el musculo esquelético, siendo además AAV9 el que indujo mayor expresión génica en el corazón. AAV8 y 9 transducían más ubicuamente que otros serotipos, pero era AAV9 el que generaba una expresión más robusta. Dentro del grupo de alta expresión, fue AAV9 quien produjo también mayor número de copias de genoma viral en todos los tejidos examinados, especialmente en hígado, corazón y musculo esquelético, excepto en testículos y pulmón. Cabe resaltar que la baja expresión en los testículos, representa una cuestión de seguridad importante para la investigación clínica futura con este serotipo.

Para la 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 m^2 (Bickel et al., 2001). Prácticamente cada neurona del cerebro tiene su propio capilar, con una distancia media de capilar a neurona de 8-20 μm (Schlageter et al., 1999). La administración de un gen terapéutico a neuronas, a través de la membrana capilar, sería entonces el método de elección. Sin embargo, es sabido 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 terapia génica, empleando virus que sufren transporte retrogrado después de la inyección intramuscular (Qing et al., 1999; Kaspar et al., 2003; Azzouz et al., 2004). Pero el desarrollo clínico de protocolos de terapia génica 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 afectadas 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. No obstante, dichos procedimientos han necesitado de inyecciones quirúrgicas en el parénquima cerebral (Kaplitt et al., 2007; Marks et al., 2008; Worgall et al., 2008). 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 por vía intraperitoneal (Blankinship et al., 2004; Nakai et al., 2005; Inagaki et al., 2006; Wang y Lieber, 2006). 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 AAV6 y AAV8 penetran pobremente en el SNC cuando son inyectados vascularmente en ratones neonatos y adultos, expresándose solamente en unas pocas células de la médula espinal (Flotte y Carter, 1995; Towne et al., 2008; Foust et al., 2009). 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 poca o ninguna reactividad cruzada con AAV9, lo que indica que este vector constituye una estirpe diferente de AAV (Gao et al., 2002, 2004, 2005). Además, comparado con otros

serotipos, AAV9 es más fácilmente transportado en el cerebro tras una inyección en el parénquima cerebral (Cearley et al., 2006).

Se sabe también que AAV9 utiliza como receptor celular primario N-glicanos con residuo de galactosa terminal (Bell et al., 2011; Shen et al., 2012; Katwal et al., 2013) y que posee un co-receptor, el receptor de laminina de 37/67 kDa (al igual que AAV2 y AAV8) (Akache et al., 2006). Aunque para llevar a cabo la unión, internalización y transducción celular, puede emplear otros receptores desconocidos.

Uno de los descubrimientos recientes más importantes, dada la compleja estructura del SNC, ha sido la habilidad de AAV9 para dirigirse tanto al cerebro como a la medula espinal, al ser administrado por vía vascular en la cola del ratón (Weitzman et al., 2003; Foust et al., 2009). En ratones neonatos, la inyección periférica intravenosa de AAV9 inducía una transducción neuronal generalizada, con un tropismo aparente en las neuronas motoras y en el ganglio de la raíz dorsal de la medula 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 en neonatos los vectores AAV9 transducen poblaciones neuronales específicas. Según lo esperado, en ratones adultos se observó expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en corazón, hígado y musculo esquelético. El 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 medula espinal (Foust et al., 2009). Además, se encontró una expresión neuronal aislada, y localizada sólo en el hipocampo y giro dentado. En comparación con ratones neonatos, en adultos se encontró una reducción marcada en la transducción de motoneuronas y ausencia de fibras GFP+ en el ganglio de la raíz dorsal. 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 medula espinal (Duque et al., 2009). Las similitudes de los hallazgos son positivas para AAV9 pero, 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+, habiéndose encontrado los mayores niveles de expresión de GFP en los ratones inyectados con altas dosis. El análisis de imagen de microscopía confocal reveló más de un 64% de

astrocitos GFP+ en la región lumbar de la médula espinal. Por tanto, estos resultados muestran un patrón de transducción cambiante, es decir, de 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 (Carter y Samulski, 2000; Cerley et al, 2008; Duque et al., 2009). 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 musculo esquelético y cardiaco. Resulta interesante esta habilidad de AAV9 para cruzar el endotelio. Las uniones estrechas del endotelio de la BHE restringen severamente la penetración a moléculas y virus. 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 perivascuales astrocíticos que rodean los capilares cerebrales (Abbott et al., 2005, 2006). Por tanto, los astrocitos pueden ser transducidos sólo cuando el virus es expuesto a los pies perivascuales 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 (Abbott et al., 2005, 2006). Hemos comentado que la estrategia preferida para terapia génica de enfermedades que afectan a áreas extensas (y también para el envejecimiento) sería administrar los vectores por vía sistémica. En este sentido, el vector AAV9 parece ser prometedor. 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 neuro-oncología, con objeto de aumentar el acceso de agentes quimioterapéuticos muy polares a tumores metastásicos cerebrales. Aunque la apertura hiperosmótica de la BHE favorece la entrada de vectores virales en el cerebro (Lowenstein, 2009; McCarty et al., 2009), la técnica es difícil, molesta y arriesgada (aumenta la entrada de todas las moléculas). Además, la barrera permanece abierta durante poco tiempo, impidiendo una masiva transducción cerebral. Estos métodos no se emplean generalmente en otras especialidades distintas a la neuro-oncología clínica. Desde el punto de vista de poder realizar una IB los resultados descritos con AAV9 son de gran relevancia, dado el ańejo interés por desarrollar vectores que crucen la BHE, y que tengan un amplio tropismo por diferentes tejidos. Incluso para enfermedades asociadas al envejecimiento, como el Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, tiene una enorme importancia que AAV9 infecte varias

regiones cerebrales. En la enfermedad de Parkinson se afectan varias áreas de los ganglios basales como, el caudado, putamen, sustancia negra y núcleos subtalámicos; y en la enfermedad de Alzheimer se afecta prácticamente toda la corteza, el hipocampo, y otras importantes regiones subcorticales. Por ejemplo, en pacientes mayores, la transducción de astrocitos podría suministrar factores neurotróficos a las neuronas que degeneran en enfermedades como las anteriormente mencionadas.

A la vista de estos datos, AAV9 parece ser actualmente el mejor candidato para una IB con garantías. Esto se debe a que llega a una amplia mayoría de tejidos y sistemas e incluso, en el mismo órgano, puede llegar a tipos celulares diferentes. Pero se desconoce cómo se comporta AAV9 en el envejecimiento, y en qué medida todos los cambios funcionales que ocurren en la senescencia afectan a su tropismo.

PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO

Teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- El envejecimiento es el principal factor de riesgo de las enfermedades crónicas.
- En el proceso normal de envejecimiento se producen múltiples cambios: en una simple célula, en órganos y sistemas, y a nivel de todo el organismo.
- Hay escasez de estudios que investiguen la biodistribución de vectores de terapia génica en el envejecimiento, así como los factores asociados al envejecimiento que influyen en la eficiencia de transducción.
- Con la posibilidad de trabajar en un modelo de envejecimiento biológico en ratón, se estará en mejor disposición de conocer y entender los mecanismos que pueden influir en la aplicación de una terapia génica efectiva para enfermedades relacionadas con el envejecimiento (predominantes en la población a mitad de este siglo).
- AAV9 es actualmente el mejor vector de terapia génica para realizar una intervención biogerontológica molecular, ya que puede: transducir células posmitóticas, persistir en las células sin causar mutagénesis insercional, inducir una expresión génica a largo plazo, presentar baja inmunogenicidad y carecer de efectos secundarios, tener alto tropismo en diversos tejidos (incluido cerebro), y administrarse de forma no invasiva (vía intravenosa).
- El tropismo de AAV9 cambia en diferentes estados de desarrollo cerebral (en ratones neonatos versus ratones adultos jóvenes).

HIPÓTESIS

- 1) Los cambios que ocurren en el envejecimiento fisiológico influyen en el tropismo de AAV9 a nivel cerebral y en órganos diana periféricos.

- 2) Dado que AAV9 es inyectado por vía intravenosa, el menor flujo sanguíneo y la disfunción endotelial propios del envejecimiento fisiológico contribuyen a un déficit de transporte vascular de AAV9, pudiendo ser ello una pieza clave en su tropismo.

- 3) El déficit en el transporte vascular de AAV9 que ocurre en el envejecimiento fisiológico tiene consecuencias en las diferentes etapas del ciclo de infección viral, a nivel cerebral y en órganos diana periféricos.

OBJETIVOS

- 1) Estudiar el tropismo de AAV9 en diferentes regiones cerebrales (tronco cerebral, cerebelo, mesencéfalo, corteza, estriado, tálamo e hipocampo) y en órganos diana periféricos (Bíceps femoral, corazón e hígado) de ratones C57BL/6J jóvenes y viejos.

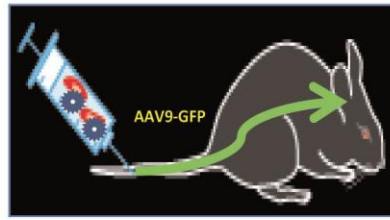
- 2) Analizar posibles factores séricos neutralizantes de AAV9 en el envejecimiento fisiológico (Figura 15, b) y estudiar su influencia en el tropismo viral.

- 3) Estudiar la influencia del envejecimiento fisiológico en el transporte endotelial de AAV9 (Figura 15, c) a nivel cerebral y en órganos diana periféricos.

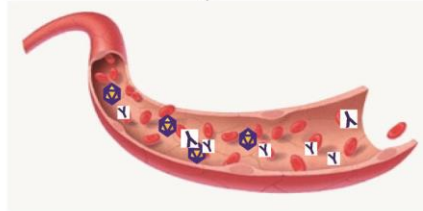
- 4) Estudiar la influencia de la disfunción endotelial asociada al envejecimiento fisiológico en las diferentes etapas del ciclo de infección celular de AAV9 (Figura 15, d) a nivel cerebral y en órganos diana periféricos.

PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

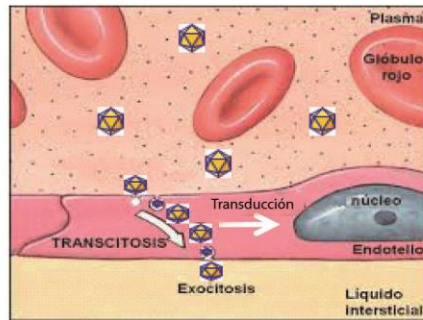
A



B



C



D

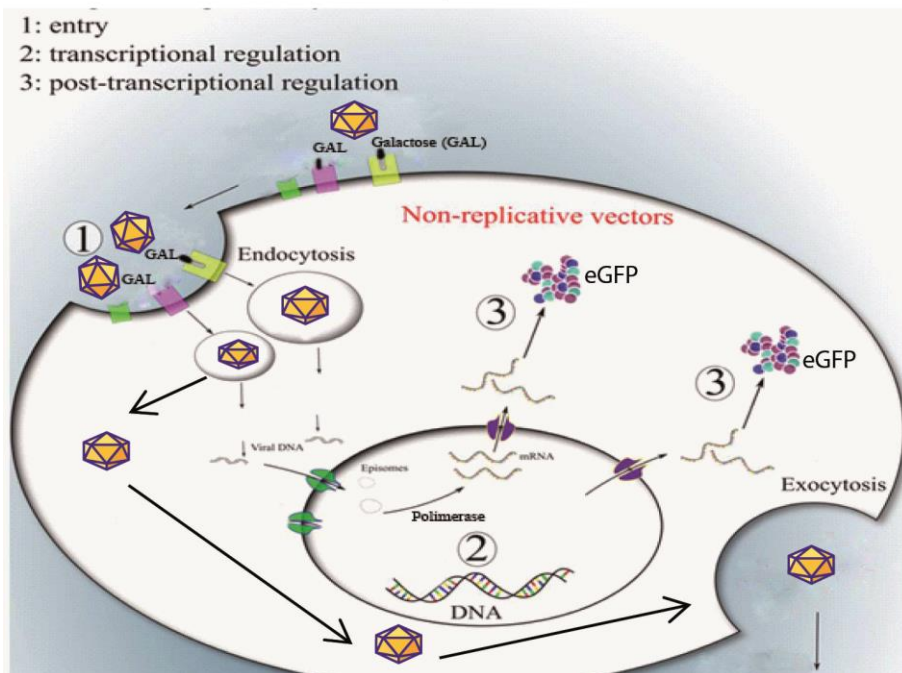


Figura 15. Esquema general del transporte y ciclo de infección celular de AAV9 en ratones. (A) Inyección intravenosa del vector AAV9-eGFP en la vena coccígea de ratones jóvenes y viejos. (B) Viaje del vector AAV9 a través del sistema vascular, donde ha de evitar factores neutralizantes que impidan la transducción. (C) Transducción del primer tipo celular que se encuentra, las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Al haber gran cantidad de partículas virales, muchas de ellas atraviesan las células endoteliales hasta el líquido intersticial, pudiendo llegar a los tejidos diana, proceso llamado transcitosis. (D) Transducción de células: para ello es necesario que AAV9 encuentre sus receptores primarios y co-receptores (como en las células endoteliales) y se produzca la entrada de AAV9 vía endosoma (1); Desde el endosoma pueden escapar las partículas virales, y salir de la célula (transcitosis) o producirse el “desnudamiento” del ADN viral. Este ADN penetra en el núcleo y la polimerasa sintetiza el ARNm (2), lo que se conoce como “transcripción”. El ARNm sale desde el núcleo al citoplasma, donde ocurre la “traducción” (3), produciéndose la proteína transgénica (eGFP).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y tratamiento

Los experimentos se realizaron en ratones machos C57BL/6J de 6 semanas y de 22 meses de edad. Los ratones se mantuvieron en grupos de 3-4 por jaula, en condiciones de temperatura constante (21-22°C), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (encendido de la luz a las 7:00 am), y con acceso libre a comida y agua. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna y respetaron la Directiva del 22 de septiembre de 2010 del Consejo de la Comunidad Europea (2010/63/UE) con respecto a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

El tratamiento consistió en inyectar intravenosamente en la vena coccígea, una dosis viral de $1,3 \times 10^{13}$ partículas virales de AAV9-eGFP por kg de peso, en suero salino. Se inyectaron un total de 8 individuos por grupo (8 jóvenes y 8 viejos) y un total de 4 ratones jóvenes con suero salino como control negativo.

Tras la inyección de AAV9-eGFP se dejaron pasar 6 semanas, antes de sacrificar a los animales, para obtener niveles óptimos de eGFP. Justo antes del sacrificio se extrajo un volumen sanguíneo de unos 300 µl por punción intracardiaca, previa anestesia (para ello usamos una mezcla de 80 mg/kg de peso de ketamina con 8 mg/kg de peso de xilazina). Cada grupo experimental fue separado a su vez en dos subgrupos:

- a) Un subgrupo empleado para estudios morfológicos (n=4 para ratones jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP y n=2 para grupo de control negativo). Este subgrupo fue perfundido transcárdiacamente con salino 0.9 % frío (8°C- 12°C) heparinizado, seguido de paraformaldehído al 4 %, tamponado con fosfato salino pH 7.4 (PBS, 50 ml). Los cerebros, los hígados, los corazones y los músculos del bíceps femoral fueron extraídos y almacenados en el mismo fijador a 4°C toda la noche. Posteriormente, los cerebros fueron crioprottegidos en un gradiente de sacarosa (10%-30%)-PBS y guardados a -80°C hasta su procesamiento. Los tejidos periféricos se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se embebieron en parafina.

- b) El otro subgrupo se utilizó para estudios bioquímicos y de biología molecular (n=4 para jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP y n=2 para grupo de control negativo). Tras la extracción de sangre, los animales fueron decapitados para realizar rápidamente la extracción de los órganos citados anteriormente. Una vez extraído el cerebro, se procedió a su disección con la ayuda de una matriz para disección de cerebros de ratón (Stoelting, Wood Dale, IL) sobre una placa refrigerada y bajo un microscopio quirúrgico (Leica MZ 9.5, Leica Microsystems, Cambridge, Reino Unido). De esa disección se obtuvo: parte del tronco cerebral, cerebelo, estriado, mesencéfalo, tálamo, corteza motora e hipocampo. Todas las muestras de órganos periféricos, y las regiones cerebrales, se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

2. Técnicas Morfológicas y de Biología Celular

2.1. Inmunohistoquímica de eGFP

Los cerebros fijados se cortaron enteros coronalmente, con un microtomo de congelación, para obtener secciones de 30 μm que se recogieron en 10 series. Los tejidos periféricos incluidos en parafina se cortaron en un micrótomos en secciones de 3 μm , y fueron colocados directamente en portas gelatinizados. Antes de comenzar la tinción inmunohistoquímica, el tejido periférico fue desparafinado con xilol y rehidratado con alcoholes graduales y agua bidestilada.

Los cortes flotantes de cerebro y los portas de tejidos periféricos se sumergieron 30 minutos en H_2O_2 al 3% para inactivar la peroxidasa endógena. Posteriormente se incubaron durante 60 minutos, a temperatura ambiente, en suero normal de cabra al 4% (NGS, Jackson ImmunoResearch) en un tampón fosfato salino 0.1M pH 7.4 (PBS), conteniendo Triton[®] X-100 al 0.05% (TX-100, Sigma) (Solución de preinmunización, PIS); luego se dejó incubar toda la noche en PIS con un 2% de NGS, y con el anticuerpo policlonal anti-eGFP de conejo (SySy, 132003; 1: 2000 en cerebro y 1: 500 en tejido periférico). Después de varios lavados, los cortes se incubaron durante 2 horas en antisuero anti-conejo biotinilado de cabra (1: 1000, Jackson ImmunoResearch), y NGS 1: 200 en PBS 1X. La reacción inmunohistoquímica se reveló mediante incubación durante 1 hora, a temperatura ambiente, con extravidina-peroxidasa de rábano (1: 5000,

Sigma) en PBS y, después de 10 minutos, con diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB, Sigma) y H₂O₂ en tampón cacodilato 0.05N pH 7.6. Las secciones se lavaron varias veces en PBS. Una vez acabado, los cerebros se montaron en portas gelatinizados y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Una vez en portas, todos los tejidos se deshidrataron mediante pases por alcoholes y xilol y se cubrieron con DPX (BDH Chemicals, Poole, Inglaterra). Se incluyó también ratones controles negativos en las mismas condiciones, dando como resultado un marcaje totalmente negativo.

2.2. Inmunofluorescencia

Para las inmunofluorescencias se utilizó el mismo método que para la tinción inmunohistoquímica, pero eliminando la inactivación de peroxidasa. Las concentraciones de los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla 2. Como bloqueante se usó suero normal del huésped en el que se utilizan los anticuerpos secundarios (NGS o NDS, Jackson ImmunoResearch). Y como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos con un fluoróforo determinado (ver tabla 2). Una vez incubados con el secundario (en oscuridad), los cortes fueron cubiertos con Vectashield Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o con una mezcla al 50% de glicerol en PBS 1X. Como control negativo se incubaron cortes sin anticuerpo primario, dando como resultado un marcaje negativo.

Tabla 1

ANTICUERPOS	ORIGEN	DILUCIÓN (APLICACIÓN)	EMPRESA	REF.
Anti-eGFP policlonal	Conejo	1: 2000 (IF) 1:20000 (WB) (Periférico) 1:5000 (WB) (Cerebro)	SySy	132003
Anti-CD 31 policlonal	Cabra	1:500 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-1506
Anti-CD 31 policlonal	Mouse	1:200 (IF)	BD Bioscience	610296
Anti-eNOS policlonal	Conejo	1: 1000 (WB)	AbCam	ab-5589
Anti-NeuN	Ratón	1: 300 (IF)	Santa Cruz Biotechnology	sc-32259
Anti-GFAP policlonal	Ratón	6 µg/ml (IF)	Millipore	AB1591P
Anti-Transtirretina policlonal	Cabra	1: 200 (IF)	Dako	A0002
Anti-Ratón-Alexa Fluor 546	Burro	6 µg/ml (IF)	Life Technologies	A-10036
Anti-Ratón-Alexa Fluor 633	Cabra	6 µg/ml (IF)	Life Technologies	A-21050
Anti-Conejo-Alexa Fluor 488	Burro	6 µg/ml (IF)	Life Technologies	A-21206
Anti-α Tubulina monoclonal	Ratón	1: 50000 (WB)	Sigma	A5441

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia y western blot.

2.3. Marcaje con Lectinas

Las lectinas son moléculas que se unen covalentemente a azúcares residuales específicos de glicoproteínas. Para este estudio se emplearon dos lectinas biotiniladas: *Erythrina cristagalli lectin* (ECL) (Vector Lab, B-1145, Burlingame, CA) que marca glicanos con un residuo terminal de galactosa (gal β 1,4 N-GlcNAc) y *Maackia amurensis I* (MAL-I) (Vector Lab, B-1315, Burlingame, CA) que marca glicanos con un residuo terminal de ácido siálico (ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc). Los estudios

realizados con ECL han demostrado que AAV9 utiliza como receptor primario glicoproteínas con galactosa terminal, para poder transducir las células (Christie Bell et al., 2011; Shen Shen et al., 2012; Katwal et al., 2013).

Los cortes de tejido periférico se desparafinaron e hidrataron (descrito anteriormente). Los cortes de cerebro y los portas de tejido periférico fueron incubados durante media hora en una solución bloqueante que contenía TBS-T (Tween al 0,5%) y Carbo Free al 1X (Vector Lab, Burlingame, CA). Posteriormente, se incubaron en TBS-T (0,05%) con las lectinas a una dilución 1:200 (ECL o MAL-I) y durante 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda (un volumen de 100 μ l por corte sobre portas o 400 μ l por pocillo en cerebros). Tras los lavados correspondientes, se incubó con extravidina CY2 (Vector Lab, Burlingame, CA; 1:600) durante una hora. Los cortes de cerebro se montaron, y se dejaron secar al aire en oscuridad. Una vez acabado, se cubrieron todos los portas con Vectashield Mounting Medium con DAPI (Vector Lab Burlingame, CA). Como control negativo durante la incubación con ECL se utilizó lactosa a una concentración de 200 mM, y para la MAL-I se usó glicoforina humana (200 mM), dando como resultado un marcaje totalmente negativo en ambos casos.

2.4.Hibridación *In Situ*

La hibridación in situ (ISH) se realizó con un ribosonda para el gen de eGFP. Para obtener la ribosonda, un fragmento de 815 pb que codifica la eGFP se escindió del plásmido pEGFP-N3 (Takara Bio Europe / Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia) utilizando las enzimas de restricción XhoI-NotI [New England Biolabs (UK)]. Se amplificó dicho fragmento y se secuenció para comprobar que era el gen eGFP. A fin de obtener la sonda antisentido, el plásmido fue linearizado con XhoI (New England Biolabs), y se transcribió con la ARN polimerasa T3 (Promega Corporation, Madison, WI). Como control se usó la sonda sentido, linearizada con NotI (New England Biolabs) y transcrita con la ARN polimerasa T7 (Promega Corporation, Madison, WI). Luego se marcaron ambas ribosondas utilizando un kit de marcaje con digoxigenina (Roche Diagnostics, Barcelona, España).

La ISH se realizó en cortes de cerebro de 30 μ m, los cuales se montaron en portas gelatinizados antes de comenzar la ISH.

En primer lugar, los cortes se incubaron dos veces en PBS 1X con dietil pirocarbonato 0,1% (DEPC, Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) durante 10 minutos. A continuación, se transfirieron los portas a una cámara de hibridación en la que se incubaron durante 3 horas a 56 ° C con 300µl de solución de pre-hibridación: formamida al 50% (Sigma-Aldrich Química SA), SSC 5X (SSC 1X: cloruro de sodio 0,15 M en tampón citrato sódico 0.015 M, pH 7,0), 2 mg / ml de ARNt de levadura (Invitrogen SA, el Prat de Llobregat, España), 2 mg / ml de ADN de esperma de salmón (Promega) y solución de Denhardt 5X (Sigma-Aldrich Química SA). Las ribosondas marcadas con digoxigenina (DIG) se calentaron a 95 ° C durante 5 minutos para desnaturalizarlas, se enfriaron seguidamente en hielo, y se añadieron a la solución de pre-hibridación a una concentración final de 100 ng / ml. Posteriormente, los portas se cubrieron con un trozo de film, y se incubaron durante toda la noche a 56 ° C. Al día siguiente, el film se retiró suavemente y los portas se lavaron a 56 ° C con: SSC 5X durante 2 y 5 minutos, SSC 2X durante 5 minutos y formamida al 50% en SSC 0,2X durante 20 minutos (Sigma-Aldrich Química SA). Los portas se lavaron luego dos veces a temperatura ambiente con SSC 0,2X y TBS-T (250 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, y 0.05% Tween 20). Después de los lavados, se incubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (3% de leche en polvo en TBS-T) y otra hora adicional con anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (1: 5000; Roche Diagnostics) diluida en una solución que contiene solución de bloqueo al 1% en TBS-T. Las secciones se equilibraron en una solución tampón con MgCl₂ (Tris 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, y MgCl₂ 50 mM) durante 5 minutos, y se incubaron en oscuridad con la solución de revelado durante toda la noche [(3.4µl / ml de nitrocloruro de tetrazolio azul (NBT) y 3.5µl / ml de una solución 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)]. La reacción se detuvo el día siguiente con TRIS-EDTA [10 mM, pH 8,0 (EDTA al 0,05 M)] seguido de tres lavados más en el mismo tampón. Por último, los portas se secaron al aire, se deshidrataron con alcoholes seriados, se fijaron con xilol, y se cubrieron con Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.). Como control negativo, el proceso de hibridación *in situ* se realizó mediante el uso de las sondas sentido.

3. Técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular

3.1. Cuantificación del malondialdehído (MDA)

Se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) de Ohkawa (Ohkawa et al., 1979). Para ello, se homogenizó 250 µg de los tejidos en 2,25 ml en KCl (1,15%). Se realizó una mezcla de 0,1 ml del homogeneizado, 0,2 ml de dodecil sulfato sódico (SDS, al 8,1%), 1,5 ml de ácido acético (20%, pH= 3), 1,5 ml de una solución al 0,8% de TBA en H₂O y, por último, 4 ml de agua destilada. Esta mezcla se calentó al baño maría durante una hora a 95°C. Luego se dejó enfriar, y se añadió 1 ml de agua destilada y 5 ml de una mezcla de n-butanol y piridina (15:1). Se agitó vigorosamente, y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se midió la absorbancia de la fase orgánica en un espectrofotómetro a 532 nm. Para la realización de una curva estándar se utilizó 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TEP). Para normalizar los datos, se realizó una extracción de proteínas de 100 µl de cada homogeneizado con M-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL), y la cuantificación se realizó por el método del ácido biciconínico (se empleó albúmina bovina como estándar). Como control negativo (blanco) se usó un tubo con 0,1 ml de KCl al 1,15% (sin 0,1 ml de homogeneizado).

3.2. Inmunotransferencia (*western-blot*)

La expresión de diferentes proteínas se estudió mediante análisis por *western-blot* (WB). Los extractos totales de proteína fueron obtenidos usando el tampón de extracción proteica M-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL). Para la cuantificación de proteínas totales en los extractos de tejidos se empleó el método del ácido biciconínico, y albúmina bovina como estándar. Para realizar *western-blot* en condiciones desnaturizantes, las muestras de proteínas se diluyeron en una solución de tampón Laemmli de carga (62.5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 20% de dodecil sulfato sódico [SDS], 1.7% de β-mercaptoetanol y 0.05% de azul de bromofenol, pH 6.8) y se desnaturizaron a 90°C durante 5 minutos. Para el WB de eNOS, se suprimió el β-mercaptoetanol del tampón Laemmli, y no se calentó la muestra (condiciones no desnaturizantes). Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida a concentraciones variables, dependiendo del peso molecular de la proteína a analizar, y se transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con un 5% de leche desnatada en TBS-T, e incubaron toda la noche a 4°C en solución bloqueante con el anticuerpo correspondiente (Tabla 2). Tras varios lavados en TBS-T con 5% de leche, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con una IgG (Anticuerpo secundario) que reconoce el correspondiente anticuerpo primario conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson-ImmunoResearch; 1: 5000). Las bandas inmunoreactivas se visualizaron por amplificación quimioluminiscente (Immun-Star, Bio-Rad, CA) usando un sistema de documentación de geles Chemi-Doc™ (Bio-Rad). Probamos diferentes cantidades de proteína, diluciones de anticuerpo y tiempos de exposición, antes de establecer el rango de trabajo de cada anticuerpo. Cada membrana de nitrocelulosa fue sometida después a tratamiento de desenmascaramiento (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol, 1 hora a temperatura ambiente) y procesada para el correspondiente control de carga, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Las densidades de marcaje para cada anticuerpo fueron comparadas con su control de carga, empleando el programa de densitometría Image Lab 4.0.1 (Bio-Rad). Un rectángulo de tamaño y forma uniforme fue colocado sobre cada banda y los valores de densidad se calcularon sustrayendo el ruido de fondo de un rectángulo de dimensiones similares situado aproximadamente 2 mm por encima de cada banda. Se realizó también los WB de los ratones controles negativos frente a eGFP, dando como resultado un marcaje totalmente negativo. Para los demás WB, se usó albúmina como control negativo.

3.3. Factores neutralizantes de AAV9 en suero

Primero se sembró una placa de 96 pocillos con células HEK293QB hasta alcanzar una confluencia del 60-70% (aproximadamente 16.000 células / pocillo) después de 24 horas de crecimiento a 37 ° C. Luego, se incubó el vector AAV9-CMV-luciferasa, a 37 ° C durante 30 minutos, con muestras de suero no inactivado por calor y diluidas en medio de infección (DMEM + FBS al 2% + PenStrep 1%) a 1:50, 1: 150 y 1: 450. A continuación, se añadieron 60 μ l de las mezclas de suero-vector a las células, por duplicado, en una concentración de 1×10^9 vg / pocillo. Cinco horas después de la infección, se añadió a cada pocillo 100 μ l de medio de crecimiento (DMEM + FBS al 10% + PenStrep al 1%) y las células se incubaron durante 48 horas a 37 ° C. Tras estos

dos días, las células se lisaron con 100 μ l de tampón de lisis (Firefly Luciferase Flash Assay kit de Pierce) y se añadió 20 μ l de cada lisado a placas nuevas de 96 pocillos. La actividad de luciferasa se detectó mediante la adición de su sustrato, luciferina (Firefly Luciferase Flash Assay kit de Pierce), y la lectura de la luminiscencia resultante se obtuvo con el luminómetro Victor 3 (Perkin Elmer). La eficiencia de transducción se expresó como luminiscencia, normalizada por la cantidad de proteína / pocillo (se utilizó el kit de BCA de Pierce), dando valores finales de luminiscencia / μ g de proteína. Los factores neutralizantes se expresan como la mayor dilución de suero que inhibe la expresión del gen (luciferasa) en más de un 50%, en comparación con el máximo de señal obtenida con el suero de los ratones controles negativos.

3.4.ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

La concentración total de inmunoglobulina G (IgG) contra el AAV9 se cuantificó en el suero de los animales. Para ello se usaron placas Nunc MaxiSorp F96, las cuales fueron cubiertas con 50 μ l de AAV9 diluidos 2×10^9 ppm/ml en tampón NaHCO_3 , 100mM, pH 9.2. Para la curva estándar, los pocillos fueron cubiertos de forma similar con 100 μ l de IgG de ratón (Sigma) en diluciones seriadas, comenzando con 1800 ng/ml. Las placas fueron incubadas a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se lavó tres veces con PBS 1X y Tween (0,5%) y se bloqueó 1 hora a 37°C con albúmina de suero bovino (BSA, 0.5%) en PBS 1X, pH 7.2. Luego se añadió a los pocillos 100 μ l de suero de cada animal, diluido previamente en un tampón de dilución, y se incubó 1 hora a 37°C. Después de los lavados, se añadió 100 μ l de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano anti IgG de ratón (1:40000) durante 1 hora a 37°C. Tras otra serie de lavados, se incubó con el sustrato 3'-3'-5'-5' Tetrametilbencidina (TMB, BD Biosciences) durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se inactivó con 100 μ l de H_2SO_4 2M y se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas de ELISA (Bio-tek power wave, software KC4 version 3.3). Las absorbancias fueron convertidas en concentraciones mediante una curva estándar.

3.5. Producción, purificación y cuantificación del vector AAV9

Los vectores AAV9 que codifican la proteína eGFP fueron sintetizados en la Unidad de Producción de Vectores de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se empleó el método de triple transfección con polietilénimina (PEI), usándose 250 µg del plásmido pAAV, 250 µg del pRepCap y 500 µg del pXX6 en 2×10^8 células HEK293. Tras 48 horas, se aislaron las células por centrifugación (200 g, 10 minutos) y se resuspendieron en 30 ml de NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8.5). A continuación, se lisaron las células con tres ciclos de congelación/descongelación, y el lisado celular se clarificó mediante centrifugación (2000 g, 10 min). El lisado clarificado se trató con 50 U / ml de Benzonasa (Novagen) (1 h, 37 ° C) y se centrifugó (3000 g, 20 min). El sobrenadante que contiene el vector se recogió y se ajustó con NaCl 200 mM. Para precipitar los vectores se añadió polietilenglicol (PEG 8000, Sigma) a una concentración final de 8%; esta mezcla se incubó (3 h, 4°C) y se centrifugó (8000 g, 15 min). El precipitado con los AAV9 se resuspendió en NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM, Tris-HCl 50 (pH 8,5) y se incubó 48 h a 4°C. Las partículas AAV fueron purificadas utilizando el método del iodixanol descrito previamente por Zolotukhin (Zolotukhin et al., 1999).

Para la cuantificación del vector, las partículas de AAV se lisaron y el genoma monocatenario se dejó hibridar hasta convertirse en ADN de doble cadena, según se describe a continuación: 2 µl de la muestra de vector purificada se mezcló con 8 µl de H₂O y 10 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, SDS al 0,2%). Estas muestras se incubaron durante 1 hora a 70°C. Una placa de color negro de 96 pocillos se cargó con 20 µl de los ADNs estándares, los 20 µl de las muestras y 20 µl de TE (controles negativos). Todas las muestras se prepararon por duplicado. A continuación, se empleó el reactivo Quant-iT™ PicoGreen dsDNA (Molecular Probes, Invitrogen) diluido 1: 200 con TE, y se añadió 180 µl de esta dilución a cada pocillo. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 5 min y luego se analizaron con un lector de placas (Perkin Elmer Wallac 1420 Victor3™; 485 nm / 535 nm). Por último, el título final de AAV9 se calculó como la diferencia entre el valor de genomas virales AAV de muestras lisadas y el valor de los genomas virales AAV de muestras no lisadas.

3.6. Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Para realizar la RT-PCR se realizó una extracción de ARN de los tejidos frescos cerebrales y de los órganos diana periféricos. Para ello se usó el método del Fenol-Cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 2006). Se homogenizó 0,3 g de tejido en nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de centrífuga de 10 ml. Se agregaron 3 ml de solución D (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, sarcosil al 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1 M) y 1 ml de acetato de sodio 2 M, pH 4, agitando 1 min en vórtex. Se añadieron 3 ml de fenol saturado y se agitó durante 2 min adicionales en vórtex. Se agregó 1 ml de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1, v/v) y se volvió a agitar en vórtex otros 3 min. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN, agregando 1 volumen de isopropanol frío, se agitó por inversión y se colocó a -20°C al menos 1 hora. Luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C, se decantó, y se lavó el precipitado en dos ocasiones con etanol al 80%. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua tratada con DEPC.

Una vez obtenidos los ARNs se empleó un tratamiento con la enzima DNasa I (Roche) de acuerdo al protocolo comercial, para eliminar la posible contaminación de ADN. El ARN se cuantificó con el NanoDrop ND-100 (Bonsai Technologies Group) y, para la RT-PCR, se partió de 100 ng de ARN para sintetizar el cDNA correspondiente con el kit iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), según el protocolo del proveedor. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador a tiempo real Mini-Opticon de 48 pocillos (BioRad, Hercules, CA) con el software Opticon (MJ Research, Waltham, MA). Como fluoróforo se usó SYBR Green I, del kit iQ™ SYBR® Green Supermix RT-PCR (BioRad, Hercules, CA). Se cargaron un total de 25µL por reacción, conteniendo 1µL de ADNc molde, 0.25 µM de cada cebador, 12.5 µL del reactivo SYBR® Green (donde están todos los componentes necesarios para la reacción) y 11µL de agua estéril Milli-Q. Cada reacción se hizo por triplicado, y como control de carga se usaron RPS18 y GAPDH.

Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 3 minutos a 95°C (desnaturalización del cDNA), seguido por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura de alineamiento de los cebadores usados (Tabla 3) y 15 segundos a 72°C. Al final de la reacción, se llevó a cabo un protocolo de

disociación para asegurar la presencia del producto específico de PCR que se intentaba amplificar. Las curvas de disociación fueron programadas, estableciendo subidas de medio grado durante 5 segundos desde los 65°C hasta los 95°C. En las PCR se incluyeron ratones (no inyectados con AAV9) como controles negativos para el ARNm de eGFP (sin dar ninguna fluorescencia), y agua como control negativo para el VEGF-A, dando también un resultado negativo.

La eficiencia de los cebadores se calculó amplificando diluciones seriadas de ADNc positivo, para cada una de las parejas de cebadores, con la siguiente ecuación:

$E = 10^{(-1/\text{pendiente de la recta})}$, siendo los valores aceptados entre 1,8 y 2,2 (El valor óptimo es 2, que sería una eficiencia del 100%).

Tras obtener los CP (ciclo en el que la fluorescencia se eleva levemente de la fluorescencia residual) se empleó el método de Pfaffl (Pfaffl et al., 2002) para comparar las diferencias entre ratones viejos y jóvenes.

Tabla 2

GEN	Cebadores 5'→3'	Amplificón	Tª de anillamiento
eGFP	F- GTTCACCTTGATGCCGTTCT R- AAGGACGACGGCAACTACAA	180 pb	55 °C
VEGF-A	F- GCAGCGACAAGGCAGACTAT R- GAGGGACTGAAGAACCAACCT	185 pb	55 °C
Promotor CMV	F- TACATAACTTACGGTAAATGGC R- AAAGTCCCTATTGGCGTTACT	105 pb	58 °C
GAPDH	R- TGTTGAAGTCGCAGGAGACA F- AATGTGTCCGTCGTGGATCT	142 pb	55 °C
Ciclofilina-B	F- TCAACCTCTCCTCTCCTGCC R- GGTTTCTCCACTTCGATCTTGC	133 pb	58 °C
RPS18	F- CGGCTACCACATCCAAGGAA R- GCTGGAATTACCGCGGCT	186 pb	55 °C

Tabla 3. Cebadores usados para la RT-PCR.

3.7. PCR Cuantitativa (qPCR)

El ADN de bajo peso molecular de los diferentes tejidos fue extraído por el método de HIRT. Se añadió a los tejidos 5ml SDS / EDTA (0,6% (p / v) SDS / 10mM EDTA) y se incubó 20 min a temperatura ambiente, para lisar las células, y muy cuidadosamente se pasó a un tubo falcon de 15 ml. El resto del proceso se realizó en condiciones de baja temperatura. Se añadió 1,25 ml de NaCl 5M frío y se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugó 4 min a velocidad máxima (16.000 g) a 4°C, y se pasó el sobrenadante a otro falcon. El ADN se extrajo con fenol, añadiendo un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (frío), mezclando por vórtex 15 seg y centrifugando 20 min a velocidad máxima (a 4°C). La fase acuosa se pasó a otro tubo falcon y se añadió PEG, 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M frío y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Seguidamente se incubó a -80°C durante 15min y se centrifugó 20 min a velocidad máxima a 4°C. El precipitado se resuspendió en 200 µl de agua MilliQ.

Una vez extraído, se cuantificó el ADN con el NanoDrop ND-100 (Bonsai Technologies Group) y se realizó una qPCR, utilizando como cebadores regiones complementarias al promotor viral (el promotor del citomegalovirus, CMV) incluido en el AAV9-eGFP utilizado (Tabla 3). El reactivo utilizado fue iQTM SYBR® Green Supermix RT-PCR (BioRad, Hercules, CA) descrito anteriormente. Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 2 minutos a 98°C, seguido por 35 ciclos de 5 segundos a 98°C, 10 segundos a 58°C y 20 segundos a 72°C. Y finalmente, un ciclo de 55°C a 20 segundos. En este caso utilizamos como control *housekeeping* el gen de la ciclofilina B (Tabla 3). Para calcular las vg / µl se realizó una curva estándar en las mismas condiciones, y de concentraciones conocidas de un plásmido que contiene el promotor del CMV.

4. Captura de imágenes

Las imágenes de inmunohistoquímica fueron tomadas con un microscopio óptico Leica DM 4000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y las imágenes de fluorescencia fueron realizadas con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV10 (Olympus FV10-ASW2Q, Shinjuku, Tokio, Japón). Para la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia, se utilizó el programa Image-J 1.47v (NIH,

Bethesda, MD). Para ello, fueron cuantificados al menos 12 campos de imágenes de los distintos tejidos (señal de intensidad media de fluorescencia) por cada uno de los 4 animales de cada grupo (jóvenes y viejos).

Para la composición de imágenes se utilizaron los programas Adobe Photoshop CS3 y Adobe Illustrator CS3 (Adobe System, USA). Para la realización de las gráficas, se empleó el GraphPad Prism 5.02v.

5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS Statistics 21, realizando una t de Student de dos colas en las comparaciones de animales viejos frente a jóvenes, siempre y cuando se certificara la Normalidad y la Homocedastacidad de los datos. Cuando no se cumplía estas premisas se usó un test no paramétrico, el test U de Mann-Whitney. Los datos son representados como las medias \pm error estándar. Un nivel de $p < 0.05$ fue considerado como crítico para asignar significancia estadística.

RESULTADOS

RESULTADOS EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

1. Reducción drástica de la expresión del transgén eGFP en tejidos periféricos de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes

Tras realizar inmunohistoquímica de eGFP en corazón, hígado y músculo bíceps femoral se observa una reducción drástica en la expresión de eGFP en los tres órganos de ratones viejos comparado con la de jóvenes (Figura 16 a-f). En las fibras cardiacas de ratones viejos hay un descenso significativo en la intensidad de señal con respecto a la de ratones jóvenes (Figura 16 a, b). Además, el endotelio vascular de corazón de ratones jóvenes se marca intensamente (eGFP⁺) (Figura 16 g, i) en relación al de ratones viejos (Figura 16 h, j). En el hígado existe una caída de expresión de eGFP en el parénquima hepático de ratones viejos, en relación a ratones jóvenes, pero no es tan drástica como en el corazón (Figura 16 c, d). Existe poca expresión de eGFP en el endotelio vascular de hígado de animales viejos (Figura 16 l) comparada con la observada en endotelio vascular de ratones jóvenes (Figura 16 k). Con respecto al tejido muscular, se muestra una disminución bastante pronunciada en la expresión de eGFP en ratones viejos con respecto a la de ratones jóvenes (Figura 16 e, f). Además, la reducción observada en la expresión de eGFP en ratones viejos es más drástica en músculo (Figura 16 f) que en los otros dos tejidos (Figura 16 b, d). Este descenso se aprecia notablemente en el endotelio vascular muscular (Figura 16 o, p) y en los paquetes de fibras nerviosas musculares (Figura 16 q, r).

Figura 16

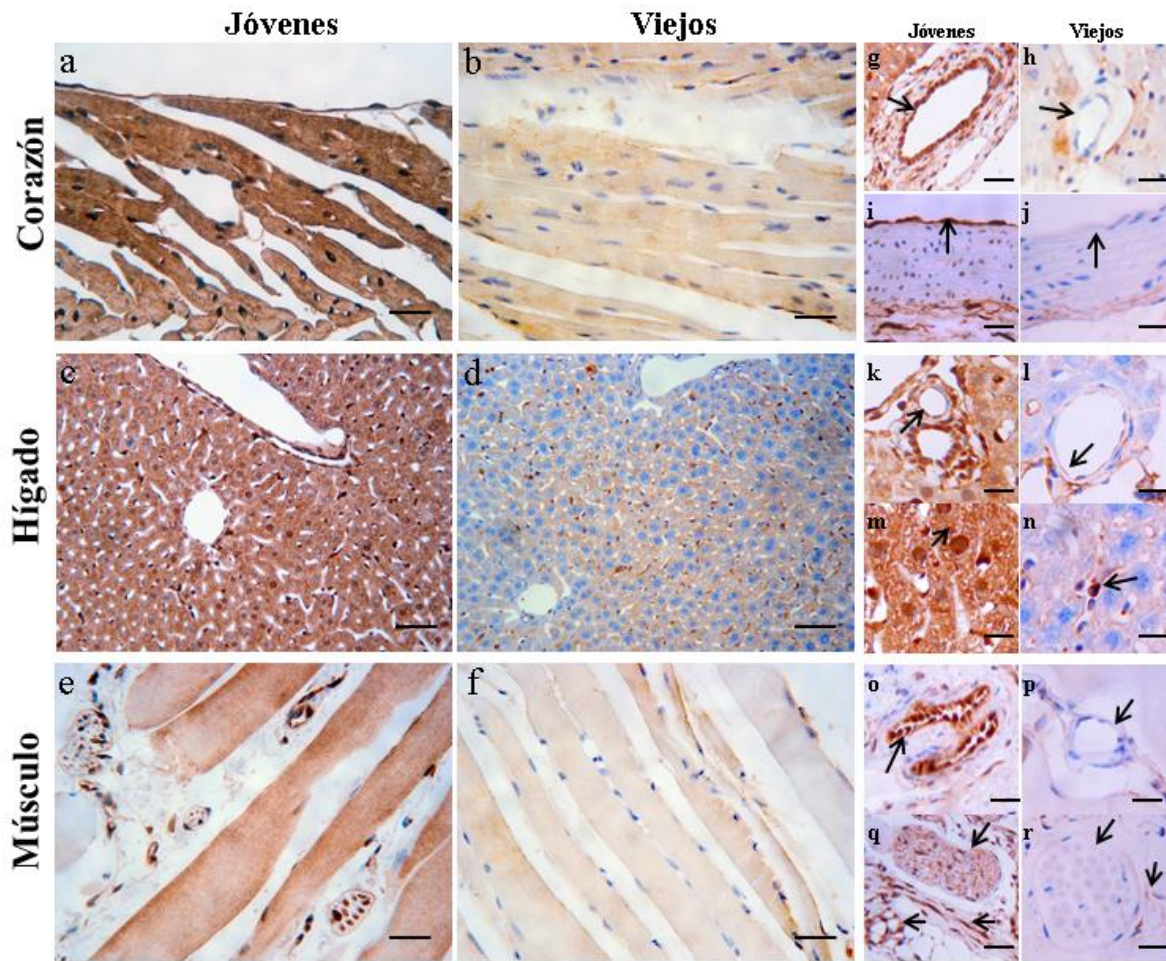


Figura 16. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de eGFP en corazón, hígado y músculo bíceps femoral de ratones jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP. (a-f) Se observa una reducción drástica de la expresión de eGFP en los tres tejidos de ratones viejos comparado con los de jóvenes. (g-h, i-j, k-l, o-p) La expresión de eGFP en el endotelio vascular de ratones viejos está también significativamente reducida en los tres tejidos. En ratones jóvenes se observa expresión eGFP⁺ en: (k) conducto biliar hepático, (q) paquete nervioso, adipocitos y fibroblastos de músculo. (m, n) En ratones jóvenes y viejos se muestra la presencia de células de tejido linfoide eGFP⁺ en el hígado. Las barras de escala son de 100 μ m (a-f) y 25 μ m (g-r).

2. Descenso significativo en los niveles de la proteína transgénica eGFP en tejidos periféricos de ratones viejos

Tras la caída observada en la expresión de eGFP, mediante inmunohistoquímica, se procedió a cuantificar los niveles de proteína eGFP por WB en corazón, hígado y músculo. En la Figura 17 se observa que existe un descenso significativo en eGFP en los tres tejidos de ratones viejos con respecto a los tejidos jóvenes. Este descenso es muy severo en el tejido muscular de ratones viejos comparado con el de ratones

jóvenes, con una disminución de un 95,5% de eGFP (Figura 17 c). Prácticamente no se detecta eGFP en el músculo de ratones viejos. En el hígado de ratones viejos el descenso de eGFP, en torno a un 75%, no es tan abrupto en relación al de ratones jóvenes (Figura 17 b). Además, comparado con los niveles de eGFP en corazón (Figura 17 a) y músculo (Figura 17 c), el hígado es el tejido con mayores niveles de eGFP en ratones viejos (Figura 17 b). Los niveles de eGFP en el corazón de ratones viejos, tienen un valor intermedio entre el hígado y el músculo, con un 88% menos (Figura 17 a).

Figura 17

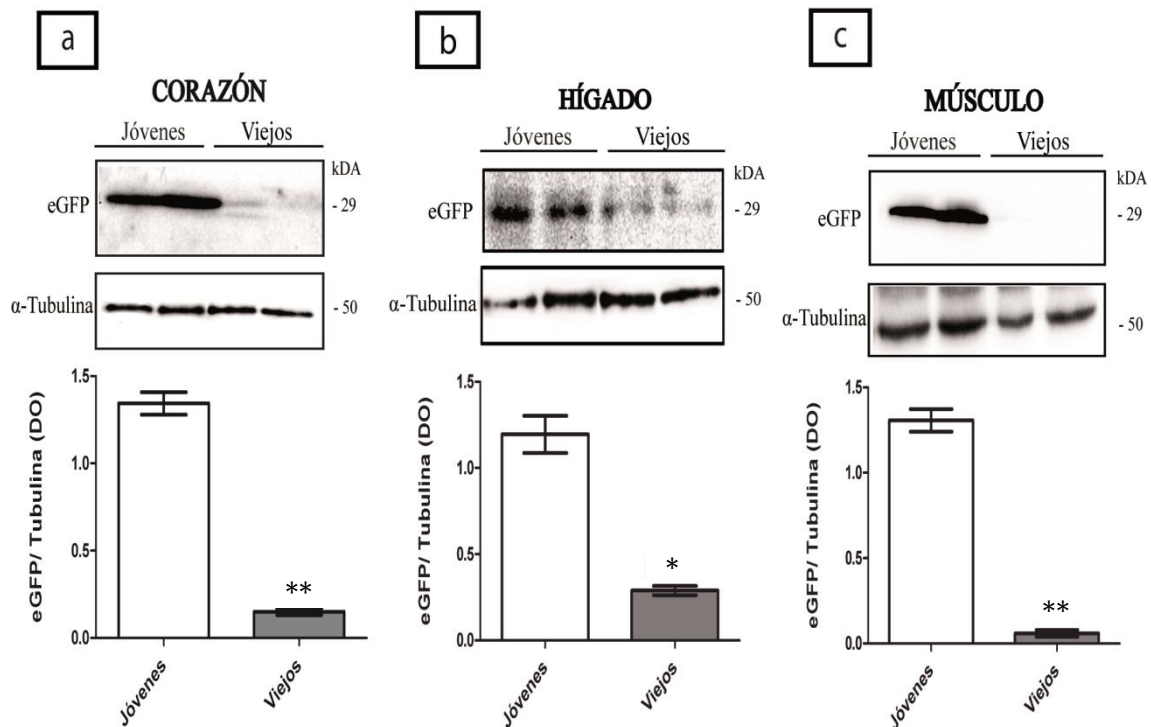


Figura 17. Imágenes representativas de western-blot de eGFP en tejidos periféricos de ratones jóvenes y viejos. Se confirma el descenso en la proteína transgénica eGFP en los tres tejidos periféricos (a-c). Se empleó α -tubulina como control de carga y una $n=4$ por grupo. Los datos de densidad óptica (DO) se representan como medias \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Se utilizó para la significación estadística una t de Student de dos colas.

3. La expresión de ARNm de eGFP y el número de partículas virales son menores en los tejidos viejos en comparación con los jóvenes

Al haber encontrado una disminución significativa de eGFP, el siguiente paso fue analizar los niveles de ARNm en los diferentes tejidos periféricos, mediante una RT-PCR, para comprobar si esta disminución se correlacionaba con una reducción en la transcripción del transgén. En la Figura 18a se muestra que los niveles de ARNm de eGFP en los tejidos de ratones viejos son inferiores a los de tejidos jóvenes. La expresión relativa de ARNm de eGFP presenta el mismo patrón que los niveles de proteína vistos anteriormente, habiéndose encontrado un *fold change* en corazón de ratones viejos con respecto a jóvenes de -4,51; en hígado fue de -2,19, y en músculo biceps femoral de -7,82. Es decir, la cantidad relativa de ARNm de eGFP en ratones viejos es mayor en el hígado, intermedia en corazón y muy baja en músculo.

La reducción obtenida de ARNm de eGFP en los tres tejidos de ratones viejos sugería que con el envejecimiento podía haber un proceso inhibitorio de regulación transcripcional y/o una menor biodistribución de partículas de vector AAV9 en los diferentes tejidos. Para estudiar esto último, cuantificamos los niveles de partículas virales por ng de tejido periférico (Vg/ng) mediante una qPCR (Figura 18 b). Los resultados obtenidos muestran que AAV9 se distribuyó significativamente menos en las células de los tejidos periféricos de ratones viejos que en las de jóvenes (Figura 18 b), siguiendo el mismo patrón de tropismo en viejos: mayor en hígado, intermedio en corazón y muy bajo en músculo (Figura 18 b). Además, estos datos revelan que en los tejidos de ratones jóvenes se observa también el mismo patrón de biodistribución de AAV9, mucho mayor en hígado, intermedio en corazón, y bajo en músculo (Figura 18 b).

El tropismo de AAV9 disminuye en los órganos periféricos de ratones viejos. Aún así, el tropismo de AAV9 en ratones viejos sigue el mismo patrón de biodistribución que en ratones jóvenes, es decir, es mayor en hígado, luego sigue en corazón y baja en músculo bíceps femoral.

Figura 18

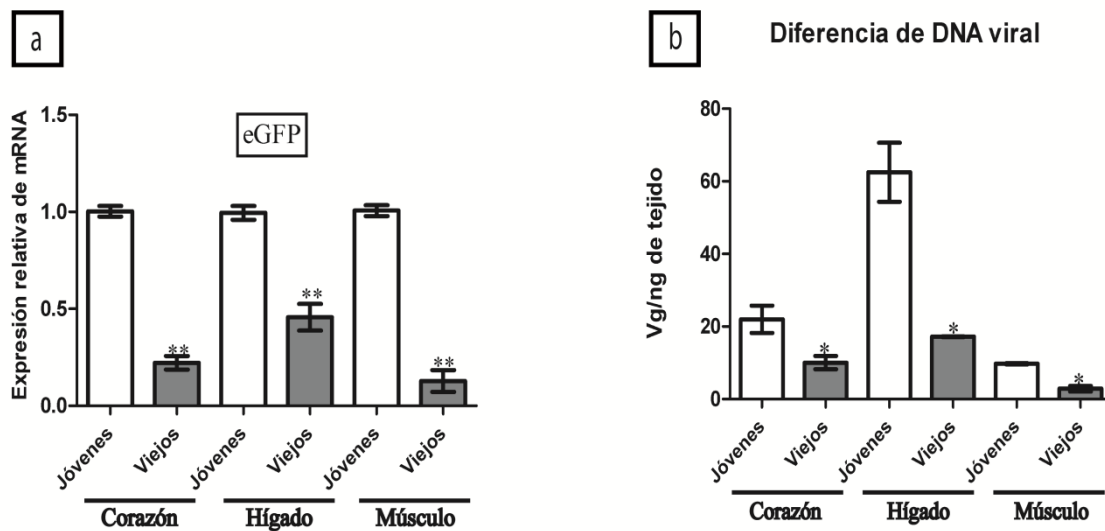


Figura 18. *Expresión relativa de RNAm de eGFP y biodistribución de AAV9 en tejidos periféricos de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes. (a) Se puede observar una caída en la expresión de ARNm de eGFP en los viejos con respecto a jóvenes. Como housekeeping en la RT-PCR se utilizó PRS18, con una n= 4 -7 por grupo. ** p < 0,01 versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas). (b) Partículas virales por ng de tejido en tejidos periféricos de ratones jóvenes y viejos. Se observa una entrada mayor de AAV9 en los tejidos jóvenes. En la qPCR se utilizó ciclofilina B como housekeeping, con una n= 4. * p < 0.05 versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas).*

4. No existen factores neutralizantes en suero responsables del menor tropismo de AAV9 en los tejidos de ratones jóvenes

Con los resultados obtenidos hasta el momento, el siguiente paso fue estudiar las razones del descenso del tropismo de AAV9 en ratones viejos. Según el esquema general que sigue el AAV9 *in vivo* (Figura 12), decidimos averiguar en primer lugar si en el suero de los ratones viejos existían posibles factores neutralizantes de AAV9 que pudiesen impedir la llegada de AAV9 a los órganos diana periféricos. Para ello utilizamos dos técnicas, el análisis de factores neutralizantes en los sueros de ratones jóvenes y viejos, y el análisis mediante ELISA de la cantidad total de inmunoglobulina-G (IgG) contra AAV9. En la primera técnica, tras usar tres diluciones de suero, no se observaron diferencias significativas entre los factores neutralizantes de AAV9 en suero de ratones jóvenes y viejos (Figura 19 a). Sin embargo, sí hubo diferencias significativas en la cantidad total de IgG contra AAV9, siendo menor en el suero de ratones viejos (Figura 19 b). Estos resultados indican que el menor tropismo de AAV9 en tejidos periféricos de ratones viejos no es debido a la presencia de factores séricos neutralizantes.

Figura 19

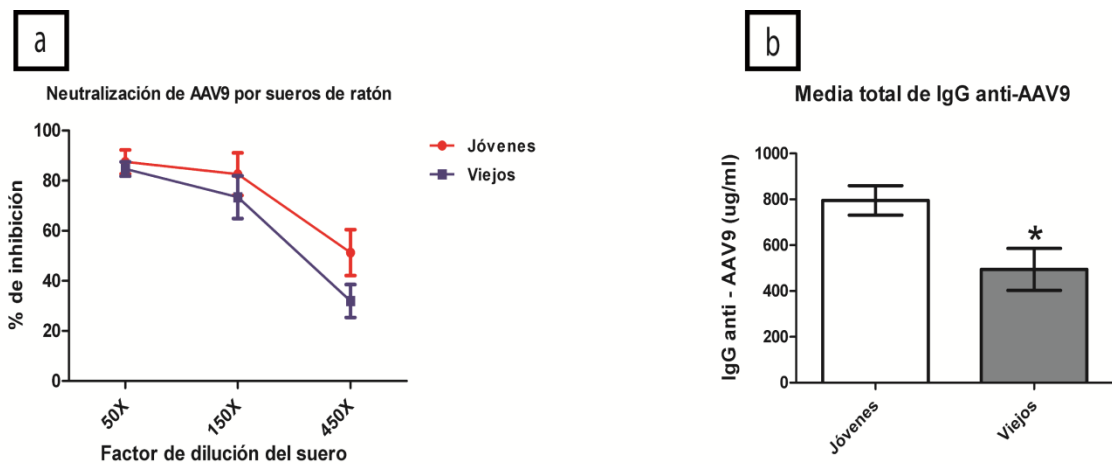


Figura 19. Análisis de factores neutralizantes de AAV9 en suero de ratones jóvenes y viejos. (a) Porcentaje de inhibición de transfección de AAV9 incubado con diferentes diluciones de suero en células HEK293. Aunque existe una tendencia a ser mayor en jóvenes, los resultados no son estadísticamente significativos ($n=6$ por grupo). (b) Niveles de IgG anti-AAV9 en suero de ratones jóvenes y viejos. Existe una reducción significativa en ratones viejos ($n=6$ por grupo) * $p < 0.05$ versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas).

5. Reducción de N-glicanos tipo gal-(β 1-4) N-GlcNAc en tejidos periféricos de ratones viejos

Debido a que los factores neutralizantes no podían ser responsables del bajo tropismo de AAV9 en los tejidos periféricos de ratones viejos, se decidió analizar la expresión del receptor primario de AAV9, mediante inmunofluorescencia con lectinas. Empleamos la lectina ECL para marcar las glicoproteínas de membrana con galactosas terminales (*gal-(β 1-4) N-GlcNAc*). Esta conformación corresponde a la de N-glicanos con galactosa terminal, la que ha de tener el receptor primario de AAV9 (Bell et al., 2011; Shen et al., 2012; Katwal et al., 2013). Tras un exhaustivo análisis de la intensidad de fluorescencia emitida por la ECL, comprobamos que los niveles de *gal-(β 1-4) N-GlcNAc* eran significativamente menores en los vasos de los tejidos periféricos de ratones viejos con respecto a los de jóvenes (Figura 20 a, b). Las diferencias entre tejidos de ratones viejos con respecto a los de jóvenes son bastantes significativas, exceptuando el hígado, en el que la reducción de N-glicanos con galactosa terminal no es tan drástica, siendo sólo del 13,1%. La disminución de *gal-(β 1-4) N-GlcNAc* en vasos de corazones viejos fue del 35,15% y en el músculo, de un 33,77%. En tejidos periféricos de ratones viejos, los niveles de *gal-(β 1-4) N-GlcNAc* son mayores en hígado, intermedios en corazón y más bajos en músculo. Y así ocurre también con el

perfil de expresión de estos N-glicanos en el grupo de ratones jóvenes, mayores niveles en hígado, luego en corazón, y niveles menores en músculo.

Figura 20

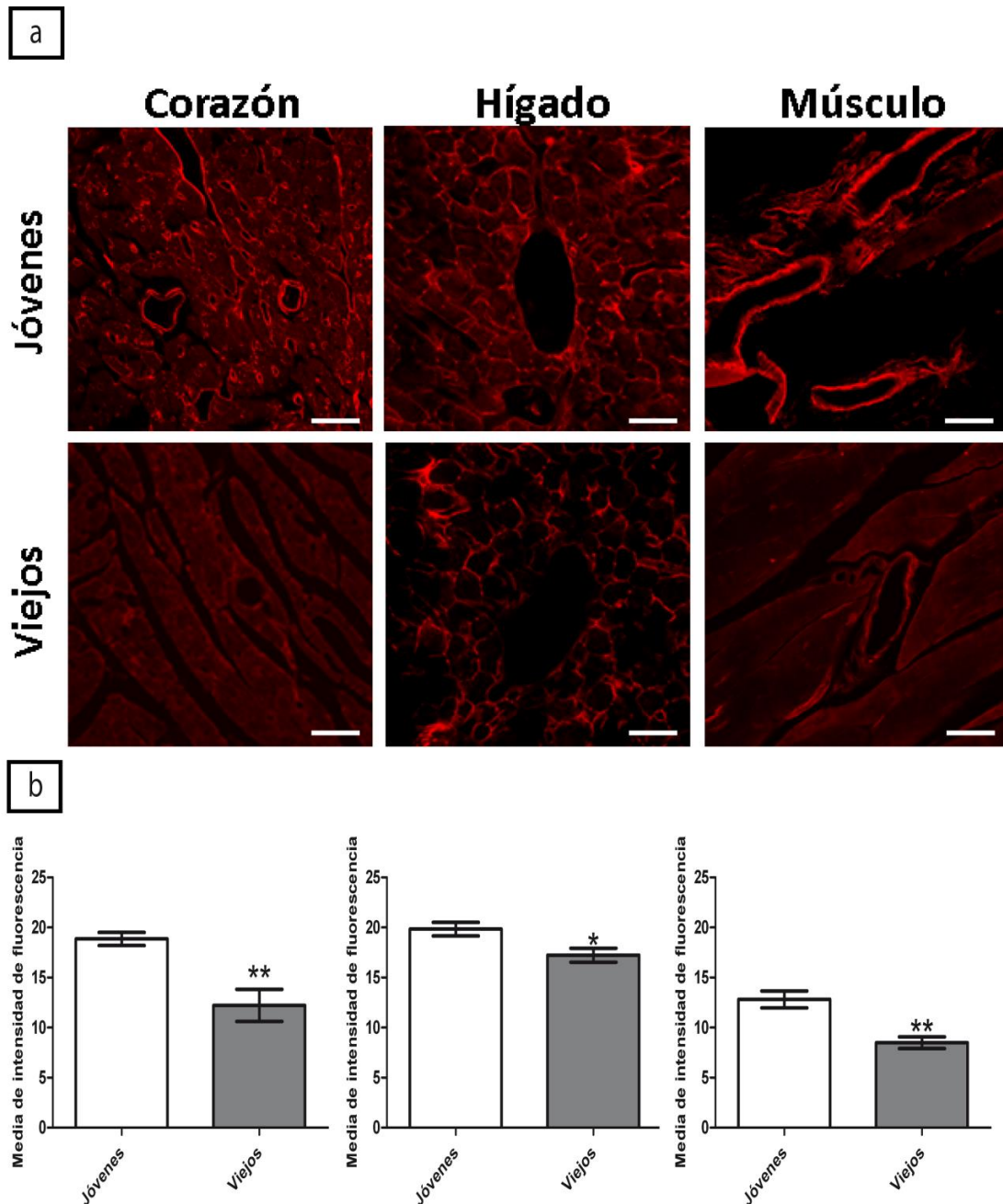


Figura 20. Marcaje de N-glicanos tipo gal-(β 1-4) N-GlcNAc con la lectina ECL en diferentes órganos periféricos de ratones jóvenes y viejos. (a) Microfotografía representativa. (b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La media de intensidad de fluorescencia es menor en los tejidos periféricos de ratones viejos que en la de tejidos de ratones jóvenes ($n=4$ por grupo); * $p < 0.05$ versus jóvenes; ** $p < 0.01$ versus jóvenes (test U de Mann–Whitney). Barra de escala de 100 μ m.

6. Reducción de N-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc en corazón y músculo, pero no en hígado, de ratones viejos

Puesto que en tejidos periféricos de ratones viejos habíamos obtenido previamente una reducción de N-glicanos con galactosa terminal, el siguiente paso fue analizar si había una inversión en el perfil de N-glicanos, en concreto, de galactosa terminal a ácido siálico terminal. Para ello se empleó el marcaje con MAL-I, la cual se une a glicoproteínas con ácido siálico (AS) terminal (ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc). Los resultados obtenidos mediante cuantificación de intensidad de fluorescencia indican, sin embargo, que existe una caída significativa de los N-glicanos con AS terminal en músculo y corazón de ratones viejos (35,65% y 28,67% respectivamente) con respecto a jóvenes (Figura 21 a, b). Pero en el hígado sí se invertía el patrón, es decir, hubo un aumento del 51,04% de N-glicanos con AS terminal en hígado de ratones viejos con respecto a jóvenes (Figura 21 a, b).

Figura 21

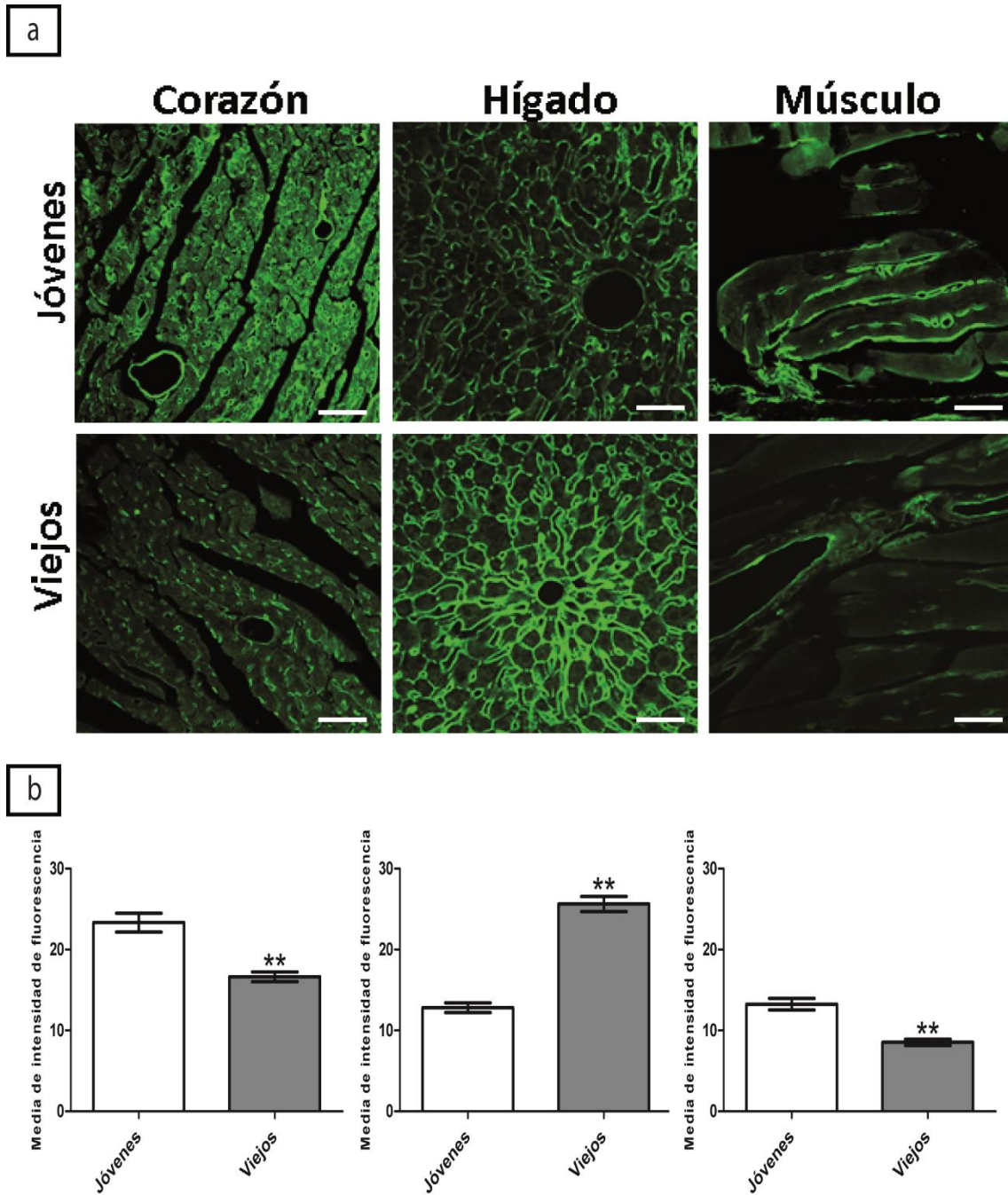


Figura 21. Marcaje de *N*-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -*N*-GlcNAc con la lectina MAL-I en diferentes órganos periféricos de ratones jóvenes y viejos. (a) Microfotografía representativa. Cuantificación de intensidad de fluorescencia. (b) La media de intensidad de fluorescencia es menor en corazón y músculo de ratones viejos, pero mayor en hígado. ($n=4$ por grupo); ** $p < 0.01$ versus ratones jóvenes (test *U* de Mann–Whitney). Barra de escala de 100 μ m.

7. Disfunción endotelial en los vasos de tejidos periféricos de ratones viejos

Se ha descrito anteriormente que los múltiples cambios ocurridos en el envejecimiento fisiológico producen un deterioro vascular que se traduce en una disminución del flujo sanguíneo en los diferentes órganos. Dado que este deterioro puede estar influyendo en el tropismo de AAV9, decidimos emplear varios marcadores endoteliales (CD31 y eNOS) para conocer el estado vascular periférico de los animales. Tras la inmunofluorescencia y cuantificación de la intensidad de señal característica de CD31, comprobamos que existe una disminución significativa del 62,5% en tejido cardiaco, y del 57,5% en músculo, de ratones viejos comparado a los de jóvenes (Figura 22 a, b). Sin embargo, para este marcador, no se observaron cambios significativos en el hígado (Figura 22 a, b).

Figura 22

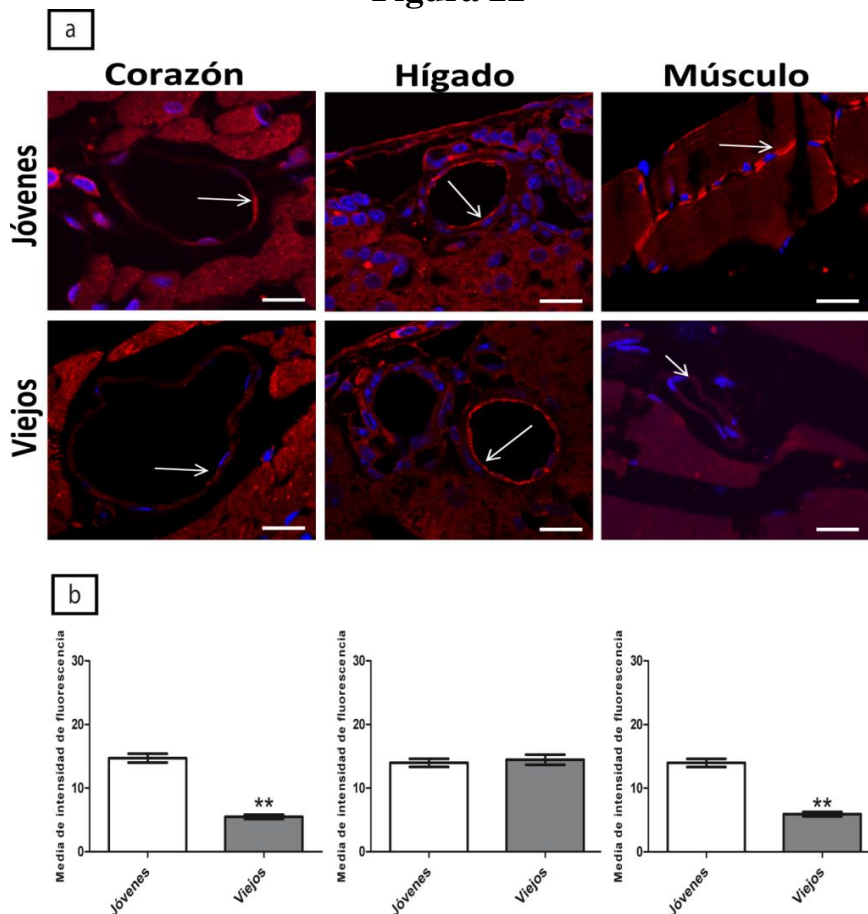


Figura 22. Expresión de CD31 en corazón, hígado y músculo de ratones jóvenes y viejos. (a) Imagen representativa de inmunofluorescencia en los tres tejidos. (b) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia. Se observa una disminución en corazón y músculo de ratones viejos, pero sin cambios significativos en el hígado. (n=4 por grupo); ** $p < 0.01$ versus ratones jóvenes (test U de Mann-Whitney). Barra de escala de 100 μm .

Debido a que CD31 suele expresarse poco en los grandes vasos hepáticos (por ejemplo, en sinusoides) empleamos también otro marcador endotelial para hígado. Utilizamos para ello la técnica de WB frente a eNOS. Para corroborar la disminución de inmunofluorescencia de CD31 observada en corazón, realizamos además WB en este órgano, ya que el grado de irrigación del tejido cardiaco es mucho mayor que el tejido muscular.

Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de un 68,3% en la eNOS de hígado de ratones viejos comparado a la de jóvenes (Figura 23 a). En cuanto a la cuantificación de CD31 en corazón, obtuvimos una reducción del 56,1% en CD31 de corazón de ratones viejos (Figura 23 b). Una diferencia un poco menor que la obtenida mediante la cuantificación de fluorescencia (Figura 22 b). Sin embargo, la caída de CD31 en corazón de ratones viejos es bastante clara por las dos técnicas empleadas.

Figura 23

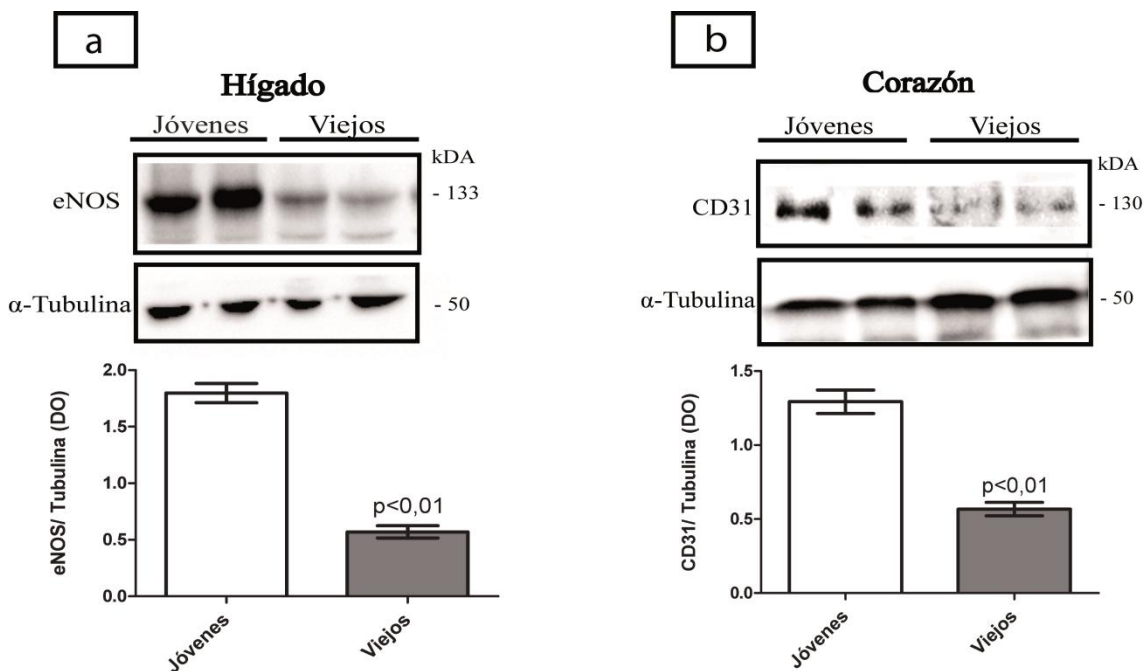


Figura 23. Imágenes representativas de western-blot de eNOS y CD31 en tejidos periféricos de ratones jóvenes y viejo. (a) Reducción de eNOS en hígado de ratones viejos. (b) Reducción de CD31 en corazón de ratones viejos. Se usó α -tubulina como control de carga y una $n=4$ por grupo. Los datos de DO se representan como medias \pm SEM; * $p < 0.01$ versus jóvenes (t de Student de dos colas).

Además de la caída observada en el envejecimiento de marcadores endoteliales asociados a la disfunción vascular, quisimos averiguar si existían cambios en factores angiogénicos, que contribuyan al deterioro vascular por falta de renovación de las células endoteliales. Para ello, estudiamos la síntesis de uno de los factores angiogénicos más importantes, el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (VEGF-A). Realizamos una RT-PCR para analizar la expresión del ARNm de VEGF-A, y obtuvimos un *fold change* de -1,84 en hígado de ratones viejos, de -2,47 en músculo de ratones viejos, y sin cambios significativos en el corazón (Figura 24). Es decir, que existe un descenso significativo en la expresión relativa de ARNm de VEGF-A en músculo y en hígado de ratones viejos, siendo el descenso más pronunciado en músculo (Figura 24).

Figura 24

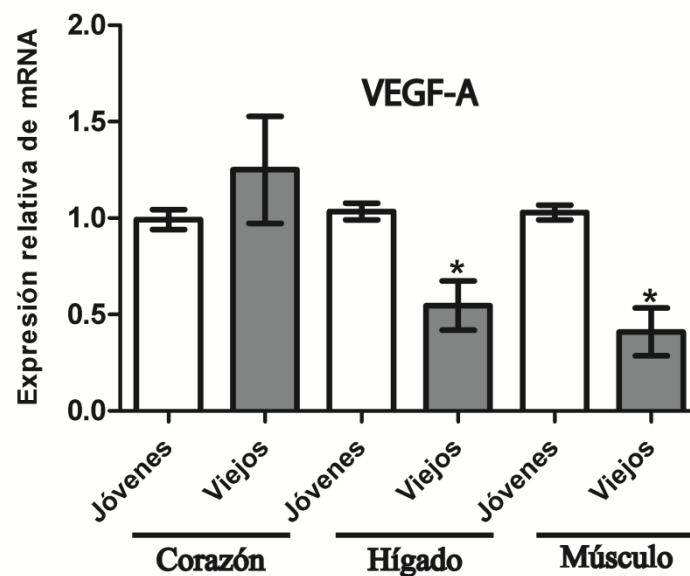


Figura 24. *Expresión relativa de ARNm de VEGF-A en tejidos periféricos de ratones jóvenes y viejos. Se muestra un descenso significativo en la expresión relativa de ARNm de VEGF-A en hígado y músculo de ratones viejos. Sin embargo, no hubo cambios significativos en corazón. Como housekeeping se utilizó PRS18 (n= 4 -7 por grupo). * p < 0.05 versus jóvenes (t de Student de dos colas).*

Por último, se sabe que el estrés oxidativo es uno de los procesos asociados al envejecimiento que más daño produce al endotelio (Yang y Chen., 2009). Ya que el estrés oxidativo aumenta con el envejecimiento (Zhang et al., 2011; Bouzid et al., 2014)

quisimos corroborar este hecho, con objeto de poder correlacionarlo con los resultados de disfunción endotelial. Para ello, cuantificamos un marcador de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados (Malondialdehído, MDA) originado a partir del aumento de estrés oxidativo. Como era lógico de esperar, hubo un aumento significativo de MDA en todos los tejidos de animales viejos con respecto a los jóvenes (Figura 25).

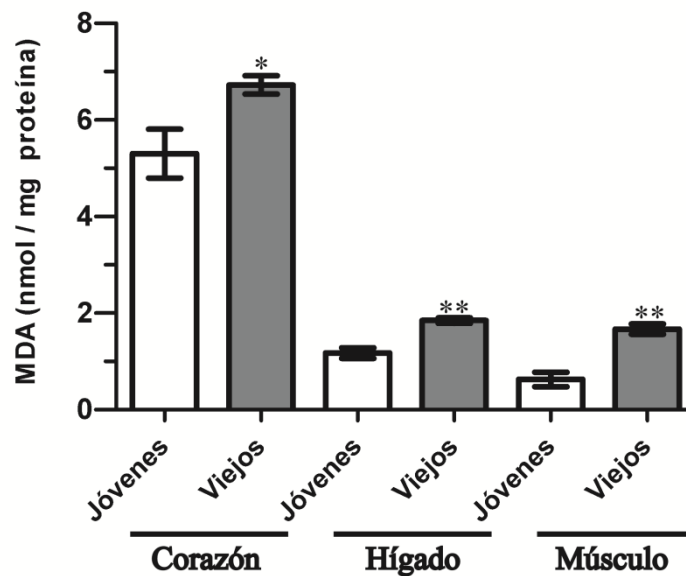
Figura 25

Figura 25. Niveles de MDA en tejidos periféricos de ratones jóvenes y viejos. Existe un aumento significativo de MDA en todos los tejidos de ratones viejos. (n=4) * $p < 0,05$ versus jóvenes ** $p < 0,01$ versus jóvenes (t de Student de dos colas).

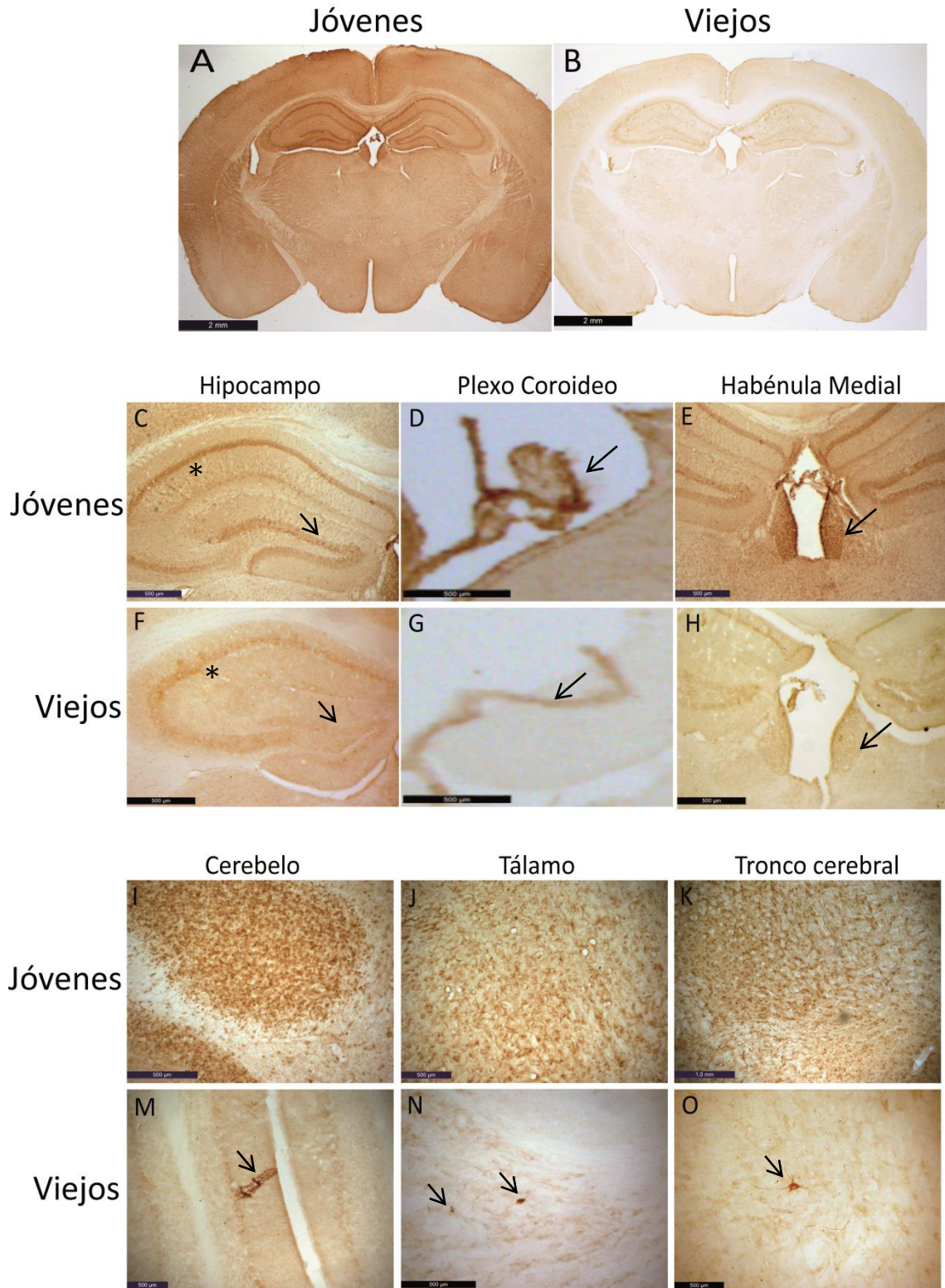
RESULTADOS EN CEREBRO

1. Reducción drástica de la expresión del transgén eGFP en cerebros de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes

Tras realizar inmunohistoquímica de eGFP en cerebro se observa una reducción drástica en la expresión de eGFP en diferentes regiones cerebrales de ratones viejos comparado con la de jóvenes (Figura 26 A-W). En la formación hipocámpica, hay un descenso significativo en la intensidad de señal de eGFP en ratones viejos con respecto a la de ratones jóvenes, siendo este más pronunciado en el *giro dentado* (GD) que en las áreas *de Amón* (CA) (Figura 26 C, F). Los plexos coroideos (PC) se marcan tanto en ratones jóvenes como en viejos, pero el marcaje es de menor intensidad en ratones viejos (Figura 26 D, G). En la zona periventricular, a nivel del tercer ventrículo, se aprecia en ratones jóvenes una intensidad eGFP⁺ elevada en el epéndimo y en el núcleo de la habénula medial (Figura 26 E). En ratones viejos se encuentra sólo un marcaje discreto en estas zonas (Figura 26 H). En el cerebelo existe una importante caída de expresión de eGFP en ratones viejos (Figura 26 M), marcándose exclusivamente neuronas de Purkinje de forma aislada (Figura 26 M). Sin embargo, en ratones jóvenes, se marca intensamente la sustancia gris del cerebelo (Figura 26 I). Este patrón se repite en los núcleos talámicos, donde apenas existe expresión de eGFP en ratones viejos, salvo alguna neurona aislada (Figura 26 N). En ratones jóvenes, hay un marcaje significativo en todos los núcleos talámicos (Figura 26 J). Con respecto al tronco cerebral, se muestra también una reducción importante en la expresión de eGFP en ratones viejos con respecto a la de ratones jóvenes (Figura 26 K, O), habiendo marcaje en sólo unas pocas neuronas en ratones viejos (Figura 26 O). Además, en ratones viejos se observa unas pocas fibras eGFP⁺ del tracto espinal trigeminal (Figura 26 V, W). En cuanto al estriado, se aprecia una reducción significativa en la expresión de eGFP en ratones viejos con respecto a jóvenes (Figura 26 P, S). A nivel del estriado de ratones jóvenes se observa también un robusto marcaje en la zona endimaria y periventricular de los ventrículos laterales (Figura 26 P), en relación a los ratones jóvenes (Figura 26 S). El descenso de eGFP, en ratones viejos, se aprecia notablemente en el mesencéfalo (Figura 16 Q, T) y en la corteza motora M1 y M2 (Figura 16 R, U), sin que en estas

regiones de los ratones viejos se observe ninguna célula eGFP⁺, como sucedía en otras zonas cerebrales.

Figura 26



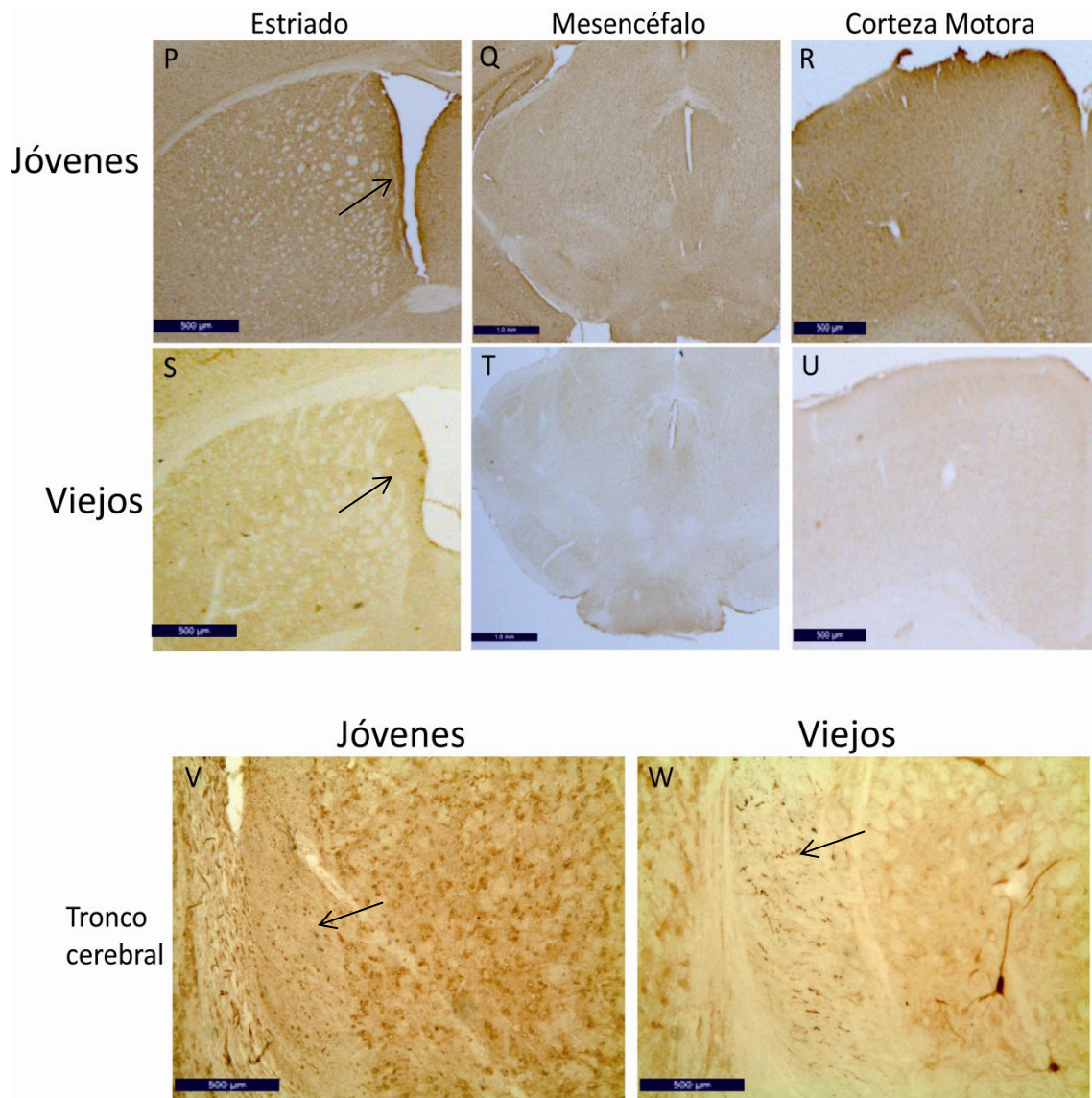


Figura 26. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de eGFP en regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP. (A, B) Se observa en general una reducción drástica de la expresión de eGFP en cerebro de ratones viejos comparado con los de jóvenes. (C, F) Existe una caída en la expresión de eGFP en la formación del hipocampo, a nivel de las áreas de Amón (*), y en Giro Dentado (→); (D, G) a nivel del ventrículo lateral, se muestra una disminución en la expresión de eGFP en el plexo coroideo de ratones viejos comparado con jóvenes; además, (E, H) a nivel periventricular (en el núcleo habenular medial, →) y en el epéndimo se observa una mayor intensidad de marcaje eGFP⁺ en ratones jóvenes y viejos, con respecto a zonas alejadas limítrofes de dicho núcleo, aunque la expresión de eGFP en el núcleo habenular medial y en el epéndimo es mucho mayor en jóvenes que en viejos. Existe también una disminución drástica de la expresión de eGFP en (I, M) cerebelo y en (J, N) núcleos talámicos de ratones viejos, observándose en ambas regiones algunas neuronas aisladas. (K, O) En tronco cerebral se observan en viejos, aunque en mayor número, neuronas aisladas eGFP⁺. (P, S) En el parénquima del estriado también disminuye la intensidad de señal de eGFP en viejos con respecto a jóvenes, destacando también en jóvenes una mayor expresión de eGFP en el epéndimo y en la zona periventricular del ventrículo lateral. En cuanto al (Q, T) mesencéfalo y (R, U) corteza motora M1 y M2 se repite el perfil general de disminución de la expresión de eGFP en ratones viejos, destacando que no se aprecian células aisladas eGFP⁺ en dichas zonas. Barra de escala de 2mm en A y B, 1 mm en K, Q y T; 500 μm en C-J, L-P, R, S y U-W.

2. Tipología celular cerebral en ratones jóvenes y viejos inyectados con AAV9-eGFP

2.1. Tropismo de AAV9-eGFP en la BHE

Para realizar el estudio de tipología celular cerebral realizamos dobles marcajes de eGFP con diferentes marcadores celulares. Utilizamos eNOS como marcador específico de células endoteliales, GFAP para astrocitos, NeuN para marcar neuronas y Transtirretina para marcar PC.

En las células endoteliales de vasos cerebrales de ratones jóvenes se observa que existe colocalización de eGFP con eNOS (Figura 27). Sin embargo, en ratones viejos sólo se observa un ligero co-marcaje en algunos vasos (Figura 27).

Figura 27

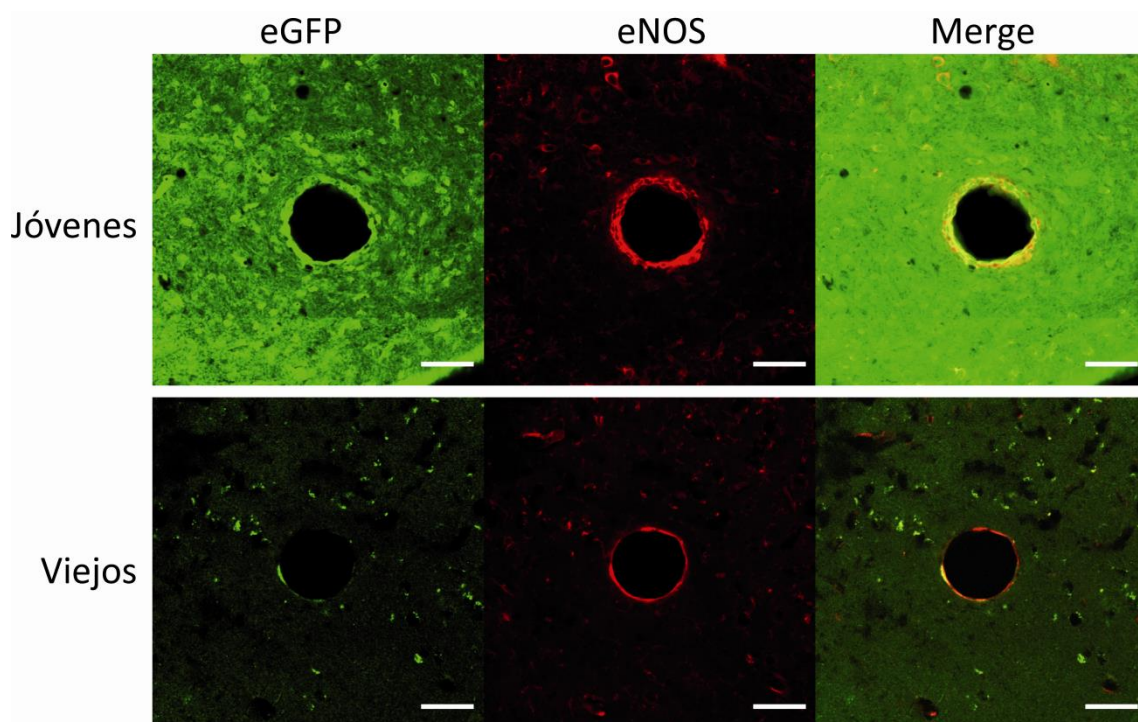


Figura 27. Imágenes representativas de tinción fluorescente de eGFP, eNOS y Merge en endotelio vascular cerebral de ratones jóvenes y viejos. Se representa en verde la expresión de eGFP, en rojo eNOS y en amarillo el co-marcaje de ambas proteínas (Merge). Se observa en jóvenes como las células endoteliales expresan gran cantidad de eGFP, mientras que en viejos la expresión es mínima. Barra de escala: 100 μ m.

2.2. Tropismo astrogial de AAV9-eGFP

El marcaje de colocalización de GFAP con eGFP nos revela que no existe prácticamente expresión de eGFP en astrocitos de ratones viejos, al contrario que en los ratones jóvenes, en los que la eGFP se expresa abundantemente en astrocitos (Figura 28). Estos hallazgos se comprobaron en todas las regiones del cerebro.

Figura 28

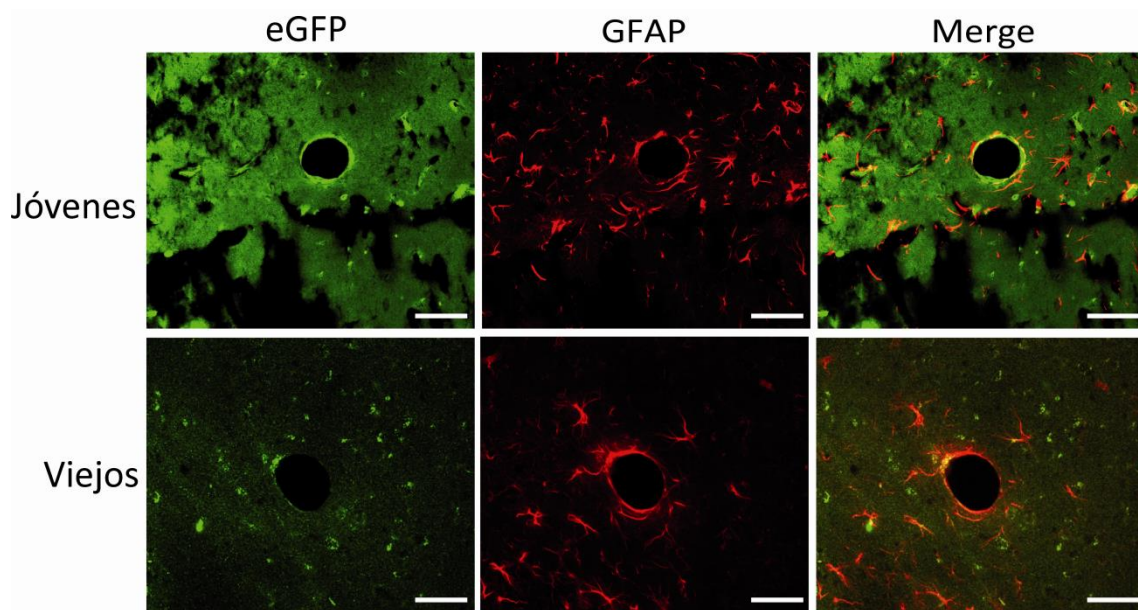
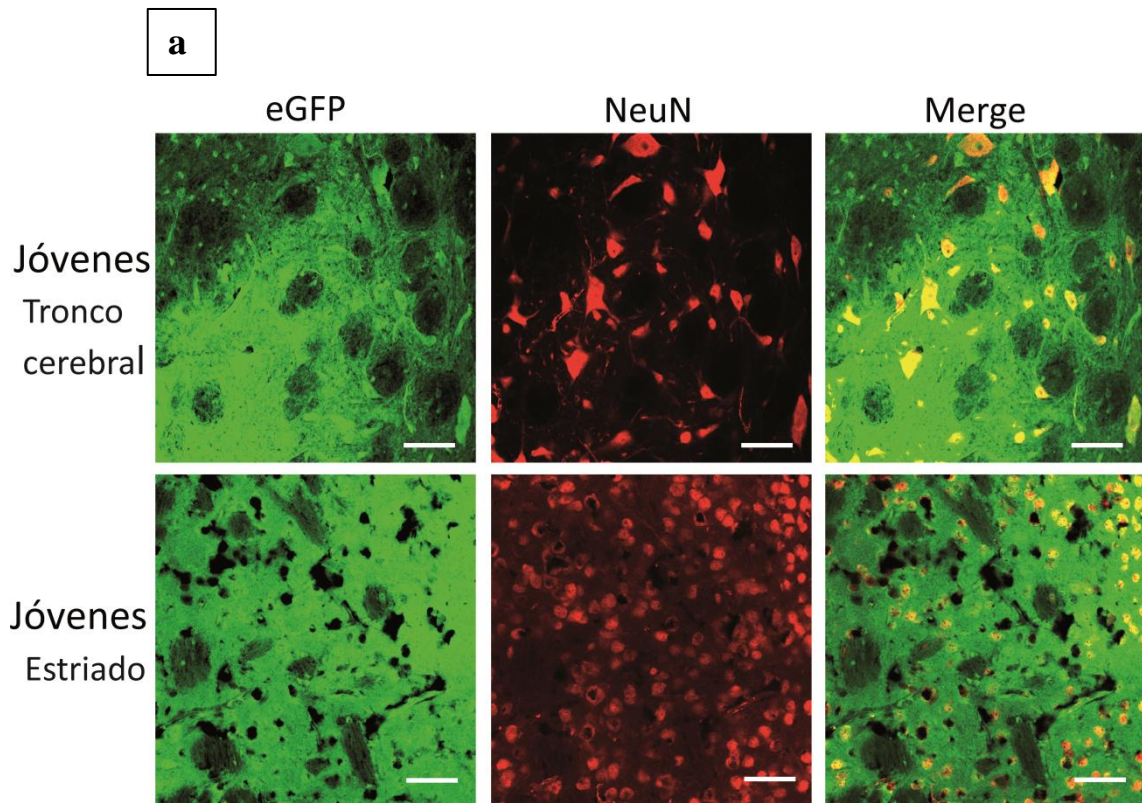


Figura 28. Imágenes representativas de tinción fluorescente de eGFP, GFAP y Merge correspondientes a astrocitos de la BHE y del parénquima cerebral en ratones jóvenes y viejos. Se representa en verde el marcaje eGFP, en rojo GFAP y en amarillo el co-marcaje de ambas proteínas (Merge). Se observa en jóvenes como los astrocitos que cubren el vaso (pies de astrocitos) expresan gran cantidad de eGFP, mientras que en viejos la expresión es mínima. La expresión de eGFP en los astrocitos del parénquima cerebral es también sensiblemente mayor en los jóvenes. Barra de escala: 100 μ m.

2.3. Tropismo neuronal de AAV9-eGFP

En cuanto al marcaje neuronal de colocalización con NeuN y eGFP, en los ratones jóvenes se marcan todas las regiones cerebrales (Figura 29 a). Sin embargo, en viejos encontramos marcajes neuronales aislados (eGFP⁺ NeuN⁺) en varias zonas, como en cerebelo, tálamo y tronco cerebral (Figura 29 b). En general, hay mayor número de neuronas eGFP⁺ en cerebelo y tronco que en tálamo.

Figura 29



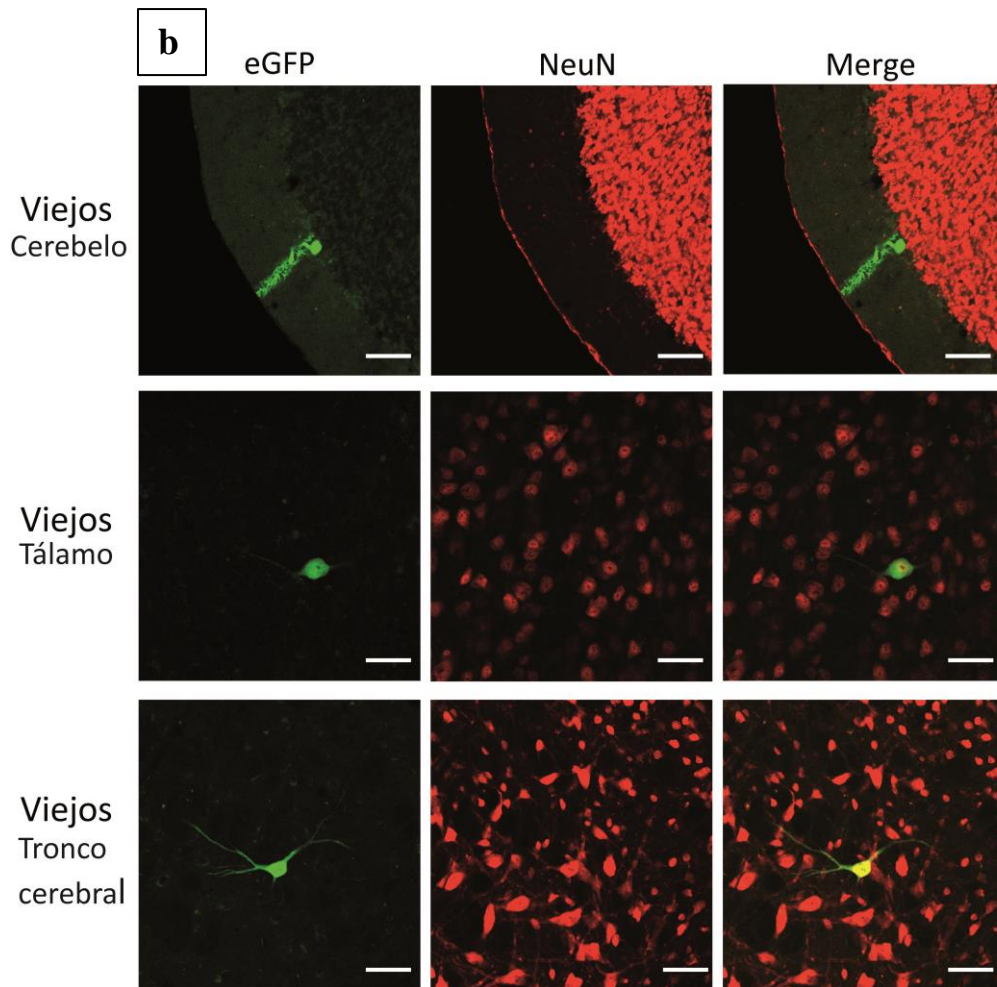
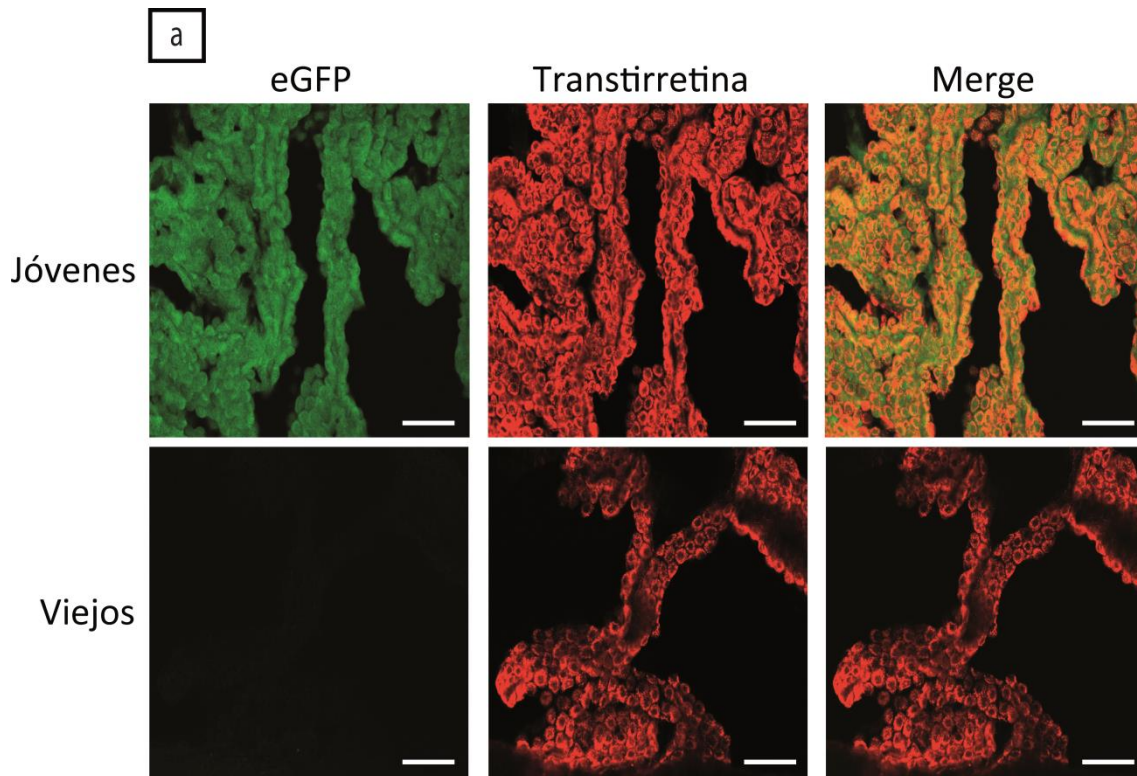


Figura 29. Imágenes representativas del tropismo neuronal de AAV9-eGFP: tinción fluorescente de eGFP, NeuN y Merge en regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos. Se representa en verde el marcaje eGFP, en rojo NeuN y en amarillo el co-marcaje de ambos (Merge). (a) En ratones jóvenes existe intenso marcaje eGFP⁺ en un número elevado de neuronas de todas las regiones cerebrales. Como ejemplo, se muestra el tronco cerebral y estriado. (b) Puede observarse también la reducción drástica de neuronas eGFP⁺ existentes en cerebelo, tálamo y tronco cerebral de ratones viejos. Barra de escala: 100 μ m.

2.4. Tropismo de AAV9-eGFP en Plexo coroideo

Con objeto de estudiar el tropismo de AAV9-eGFP en la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, en el plexo coroideo (PC), utilizamos marcaje de colocalización de transtirretina (marcador específico de PC) y eGFP. También utilizamos eNOS con eGFP para ver los vasos en los PC. Se observa una gran expresión de eGFP en los vasos y en las células epiteliales del PC de ratones jóvenes, y muy poca expresión en PC de viejos (Figura 30).

Figura 30



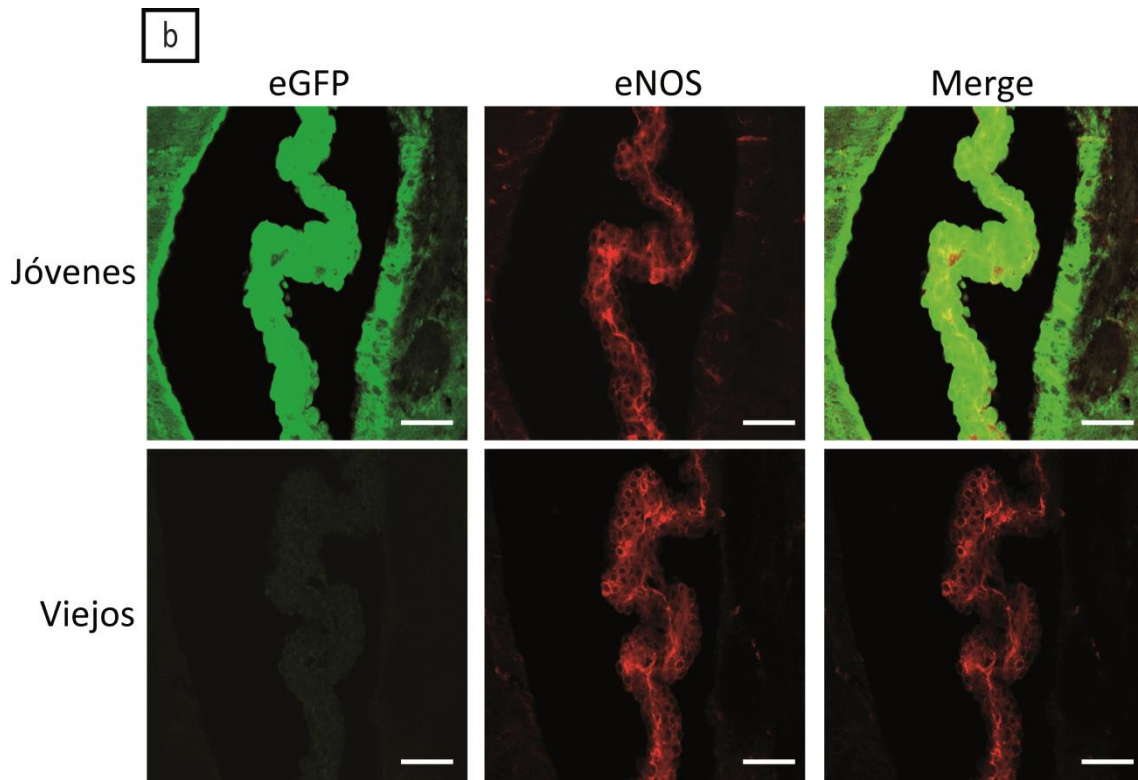


Figura 30. Imágenes representativas de tinción fluorescente de eGFP, transtirretina, eNOS y Merge, en Plexo Coroideo de ratones jóvenes y viejos. (a) Imagen representativa de eGFP (verde), transtirretina (rojo) y merge (amarillo) de plexo coroideo en tercer ventrículo de ratones jóvenes y viejos. (b) Se representa en verde el marcaje eGFP, en rojo eNOS y en amarillo el co-marcaje de ambas proteínas (Merge) en plexos de ventrículo lateral. Existe un descenso en la expresión de eGFP en PC de ratones viejos con respecto a jóvenes tanto en células como vasos de los plexos coroideos. Barra de escala: 100 μ m.

3. Descenso significativo en los niveles de la proteína transgénica eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos

Tras la caída mostrada en la expresión de eGFP, mediante inmunohistoquímica, procedimos a cuantificar los niveles de proteína eGFP por WB en las diferentes regiones cerebrales. En la Figura 31 se observa que existe un descenso significativo de al menos un 70% de eGFP en todas las regiones de cerebros de ratones viejos con respecto jóvenes. Este descenso es muy drástico en mesencéfalo (89,08%), cerebelo (88,35%) y tálamo (93,02%) (Figura 31 e, f, g). En el resto de zonas, hipocampo, estriado, tronco cerebral y corteza el descenso está en torno a un 70% (Figura 31 a, b, c, d).

Figura 31

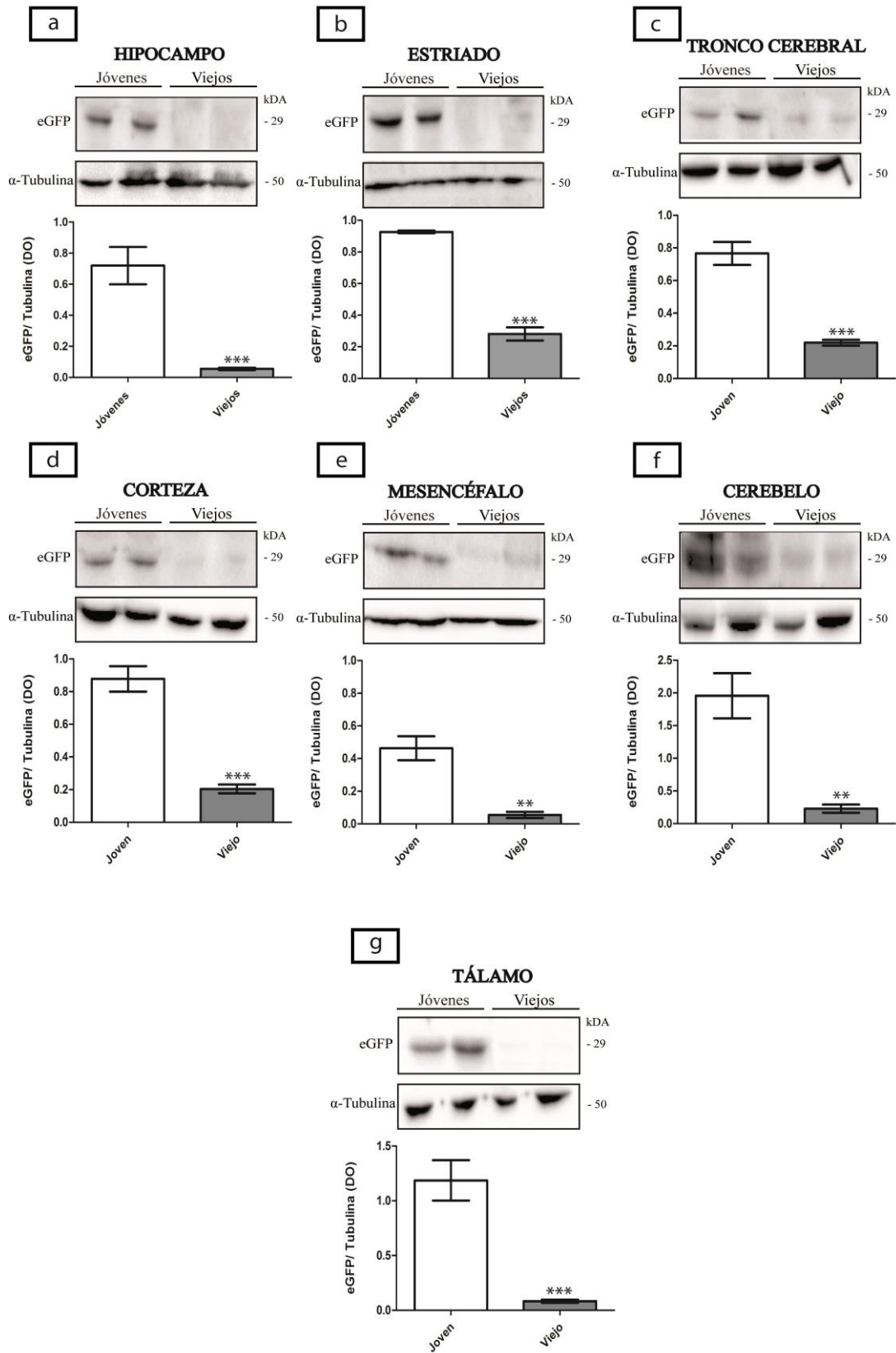


Figura 31. Imágenes representativas de western-blot de eGFP en regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos. (a-g) Se confirma el descenso en la proteína transgénica eGFP en todas las zonas cerebrales. Se empleó α -tubulina como control de carga y una $n=4$ por grupo. Los datos de densidad óptica (DO) se representan como medias \pm SEM; ** $p<0,01$, * $p<0,001$. Se utilizó para la significación estadística una t de Student de dos colas.**

4. Los niveles de ARNm de eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos son menores en comparación con los de jóvenes

Tras la caída drástica de eGFP en el cerebro, el siguiente paso fue analizar los niveles de ARNm de GFP para estudiar la transcripción del transgén, como hicimos en tejido periférico. Para ello utilizamos dos técnicas: RT-PCR e *hibridación in situ* (HIS). Los resultados de HIS corroboraron una disminución del ARNm de eGFP en todas las regiones cerebrales de ratones viejos (Figura 32 A- L).

Los datos cuantitativos de RT-PCR muestran un *fold change* de expresión del ARNm de eGFP de ratones viejos respecto a jóvenes de: -14,78 en hipocampo, -10,01 en estriado, -28,98 en corteza, -8,33 en tálamo, -2,22 en cerebelo, -7,63 en mesencéfalo y -2,85 en tronco cerebral. Las diferencias son muy similares en todas las regiones del cerebro, salvo en la parte más posterior, en tronco cerebral y cerebelo, donde el descenso de ARNm de eGFP no es tan drástico (Figura 33).

Figura 32

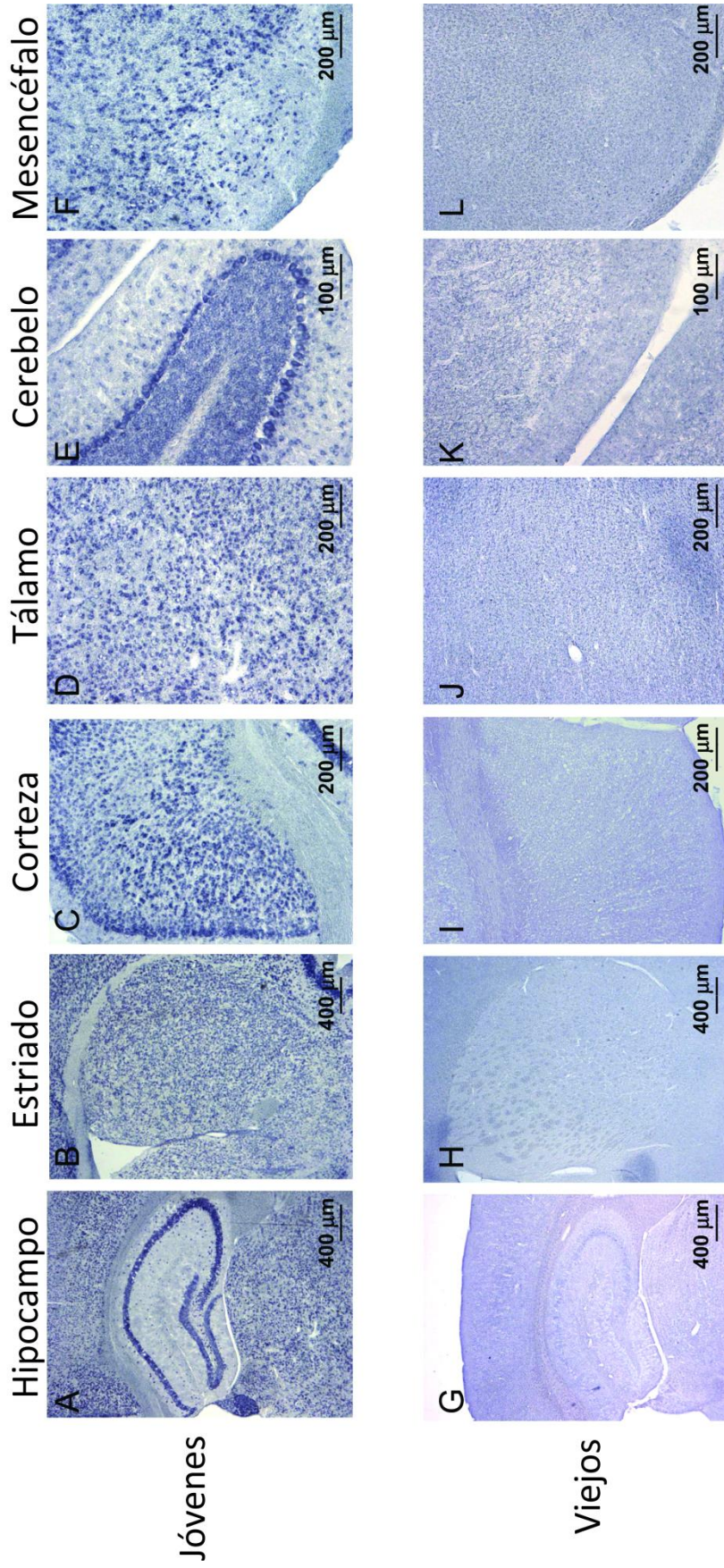


Figura 32. Descenso drástico de los niveles de ARNm de eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos con respecto al de jóvenes. Imagen representativa de HIS en diferentes regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos, correspondiente a (A, G) hipocampo, (B, H) estriado, (C, I) corteza, (D, J) tálamo, (E, K) cerebelo y (F, L) mesencéfalo. Se observa una clara expresión y distribución de ARNm de eGFP en todo el cerebro de ratones jóvenes, y prácticamente una expresión nula en cerebros de viejos. Las barras de escala son de 400 μm en A, B, G y H; 200 μm para C, D, F, I, J y L; y 100 μm en E y K.

Figura 33

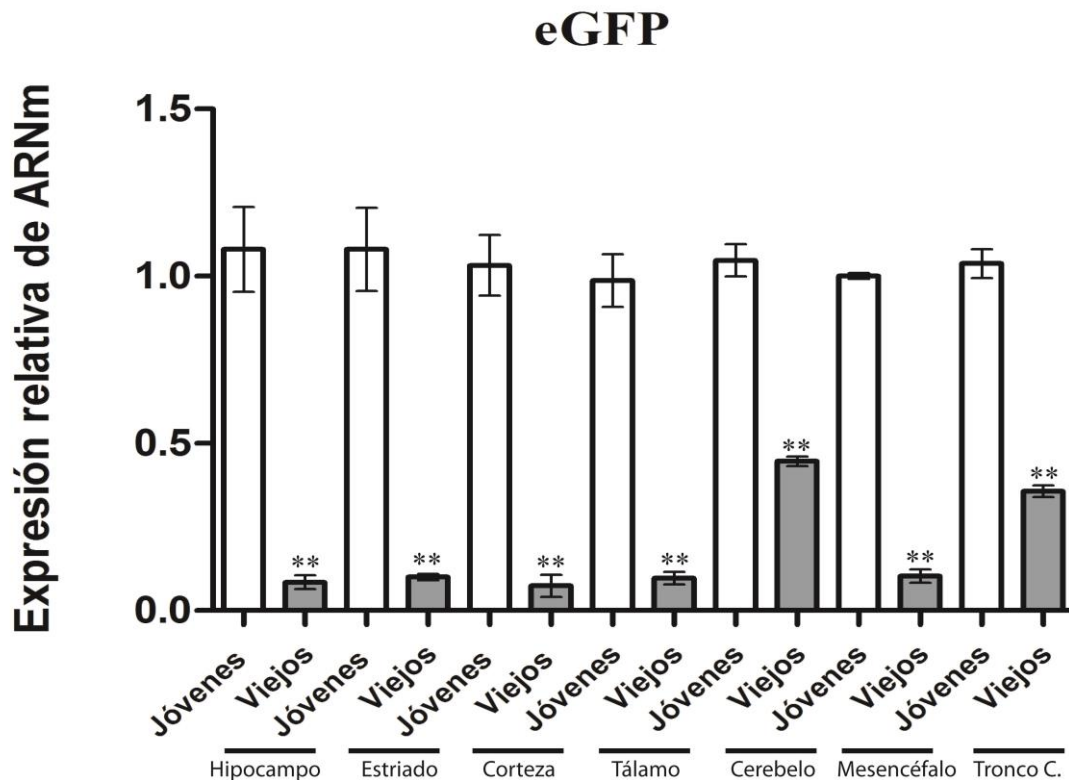


Figura 33. *Expresión relativa de ARNm de eGFP en regiones cerebrales de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes. Se observa una gran caída en la expresión del ARNm de eGFP en regiones del cerebro de ratones viejos. Como housekeeping se utilizó GAPDH, con una n= 4 por grupo. ** p < 0,01 versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas).*

5. Menor incorporación del AAV9-eGFP en el cerebro de ratones viejos

A continuación analizamos la incorporación de AAV9-eGFP en las regiones cerebrales, y para ello cuantificamos los niveles de partículas virales por ng de tejido cerebral (Vg/ng) mediante una qPCR. En la Figura 34 se muestra una reducción drástica en la incorporación de AAV9-eGFP en las regiones cerebrales de ratones viejos, comparada con la de ratones jóvenes. Además, los resultados obtenidos corroboran que existe una mayor entrada viral en las regiones posteriores del cerebro de ratones viejos, concretamente, en el cerebelo y tronco cerebral. Este patrón de biodistribución de AAV9-eGFP, en tronco cerebral y cerebelo, se conserva también en ratones jóvenes. Prácticamente no hay incorporación de AAV9-eGFP en las demás regiones cerebrales de ratones viejos. En hipocampo de ratones viejos hay un 82,48% menos de partículas

virales con respecto a jóvenes. En estriado y tálamo, la caída es similar, de un 84% y un 80,2% respectivamente. Sin embargo, en cerebelo, aunque la disminución sea casi del 97%, la entrada de partículas virales en ratones viejos, en términos absolutos, es mayor que en las demás regiones cerebrales. Esto se debe a que en ratones jóvenes la entrada de AAV9-eGFP en cerebelo es la mayor de todas las zonas. La disminución en el tronco cerebral es del 80% en ratones viejos, siendo la entrada de AAV9-eGFP mayor que en las demás zonas, salvo en cerebelo (Figura 34).

Figura 34

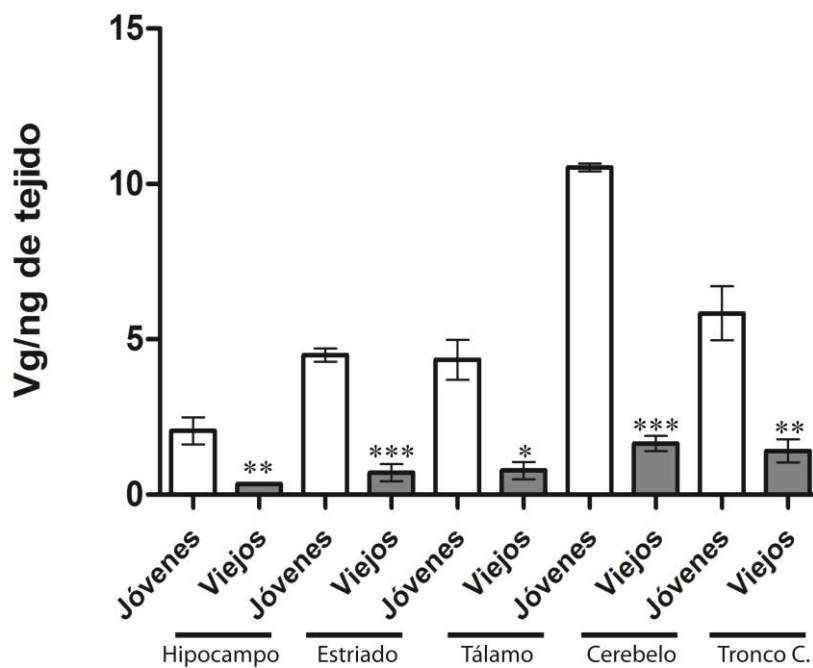
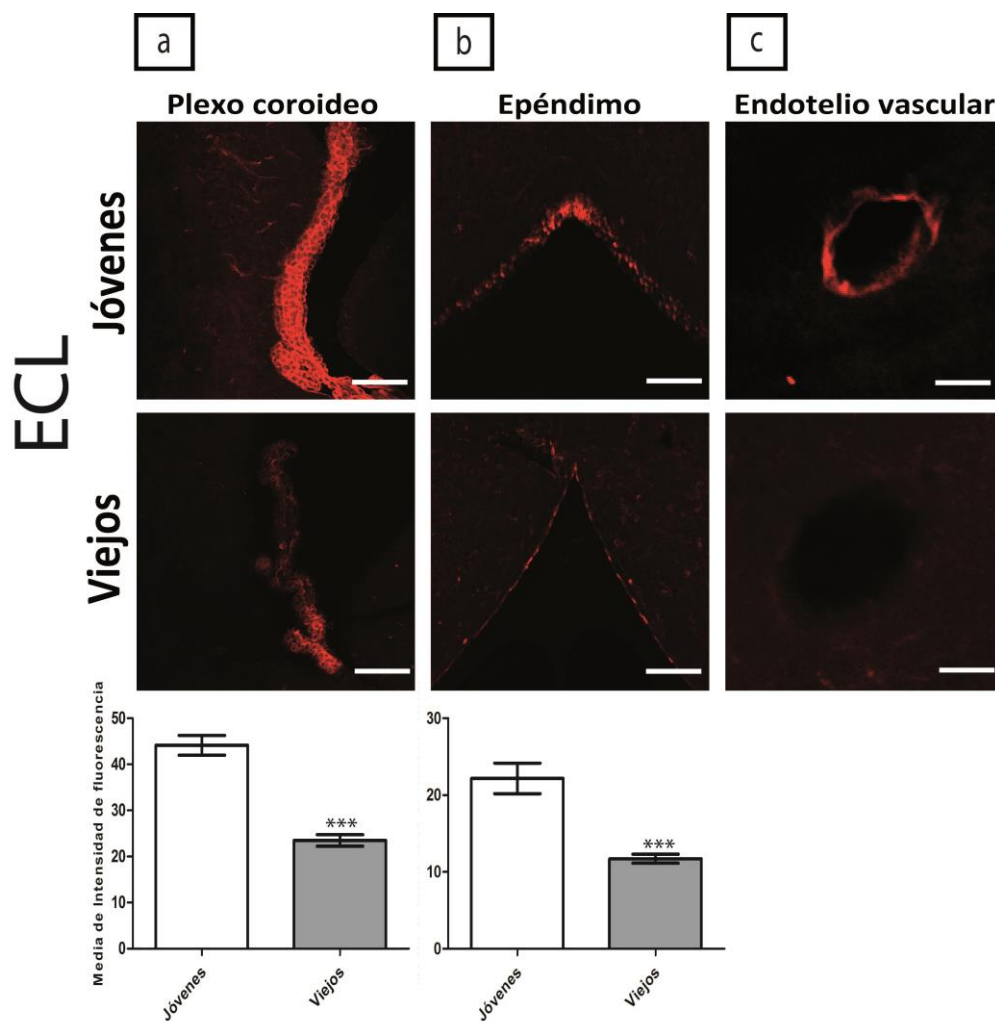


Figura 34. *Partículas virales por ng de tejido en regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos. Se observa una entrada mayor de AAV9 en las regiones cerebrales de ratones jóvenes. En la qPCR se utilizó ciclofilina B como housekeeping, con una n= 4. * p < 0.05, **p < 0,01 y *** < 0,001 de ratones viejos versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas).*

6. Reducción de N-glicanos tipo gal-(β 1-4) N-GlcNAc en plexos coroideos y epéndimo de ratones viejos.

Realizamos el marcaje del receptor primario de AAV9 con la lectina ECL, pero no encontramos marcaje generalizado de ECL ni en el cerebro (vasos y parénquima) de ratones jóvenes ni en el cerebro de viejos. En cerebro de ratones jóvenes, sólo se marcaron unos pocos vasos (ECL^+) de forma aislada (Figura 35 c). En cerebro de ratones viejos no se encontraron vasos ECL^+ (Figura 35 c). Sin embargo, habían estructuras que sí mostraban bastante intensidad (ECL^+) en ratones jóvenes como son: plexos coroideos, y las células endodimarias que tapizan el tercer y cuarto ventrículo (Figura 35 a, b). Cuantificamos la intensidad de marcaje ECL en los plexos y el epéndimo, encontrándose un descenso del 46,77% y de 47,15% en plexos coroideos y en epéndimo, respectivamente, de ratones viejos comparados a jóvenes (Figura 35 a, b).

Figura 35

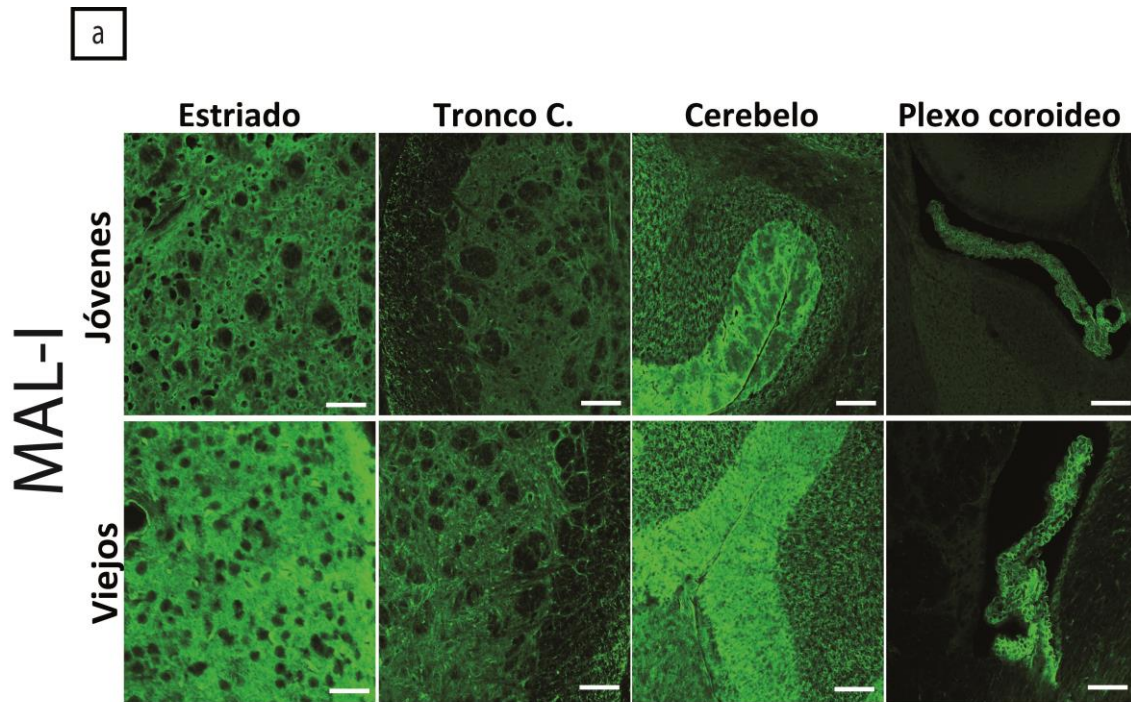


*Figura 35. Marcaje de N-glicanos tipo gal-(β 1-4) N-GlcNAc con la lectina ECL en cerebros de ratones jóvenes y viejos. (a) Microfotografía representativa de marcaje con ECL en plexo coroideo del ventrículo lateral y cuantificación de la intensidad de fluorescencia, (b) en el epéndimo del cuarto ventrículo y su cuantificación e (c) imagen de un vaso ECL⁺ en cerebro de ratón joven. La media de intensidad de fluorescencia ECL⁺ es menor en las zonas cerebrales de ratones viejos que en las de ratones jóvenes (n=4 por grupo); *** p < 0.001 versus jóvenes (test U de Mann-Whitney). Barra de escala de 100 μ m.*

7. Aumento de N-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc en regiones cerebrales de ratones viejos

Al igual que en tejidos periféricos, se empleó también el marcaje con MAL-I para diferentes regiones cerebrales (Figura 36 a). Los resultados obtenidos mediante cuantificación de intensidad de fluorescencia indican, sin embargo, que existe un aumento significativo de N-glicanos con AS terminal en regiones cerebrales de ratones viejos (Figura 36 b). A diferencia del marcaje con ECL, con la MAL-I el marcaje es más uniforme en todo el cerebro, encontrándose un aumento de marcaje en todas las regiones del cerebro de ratones viejos (Figura 36 a) prácticamente similar, de un 36,56% (Figura 36 b).

Figura 36



b

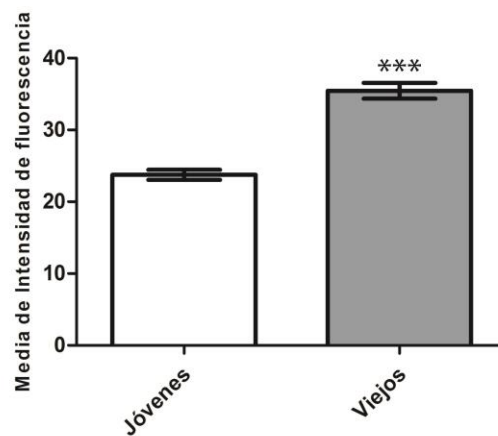


Figura 36. Marcaje de N-glicanos tipo ácido siálico α 2,3 -N-GlcNAc con la lectina MAL-I en diferentes regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos. (a) Microfotografías representativas de marcaje con MAL-I en diferentes regiones: estriado, cerebelo, tronco cerebral y plexo coroideo. (b) Cuantificación de intensidad de fluorescencia MAL-I⁺ en cerebro de ratones jóvenes y viejos. La media de intensidad de fluorescencia es mayor en cerebro de ratones viejos. (n=4 por grupo); *** p < 0.001 versus ratones jóvenes (test U de Mann–Whitney). Barra de escala de 100 μ m.

8. Disfunción endotelial en los vasos cerebrales de ratones viejos

Como en los tejidos periféricos, estudiamos el grado de deterioro vascular en todo el cerebro. Para ello, empleamos como marcador endotelial un anticuerpo frente a eNOS (Figura 37 a, b). Tras la inmunofluorescencia y cuantificación de la intensidad de señal de eNOS en prácticamente todas las regiones cerebrales, comprobamos que existía una disminución significativa media de un 43,07% de la señal de eNOS en vasos de cerebros de ratones viejos con respecto a los de los jóvenes (Figura 37 a). También quisimos cuantificar por separado el marcaje de eNOS en los vasos que irrigan los plexos coroideos. En este caso, la caída de la señal de eNOS fue un poco mayor en los plexos de ratones viejos, es decir, de un 51,04% (Figura 37 b).

Figura 37

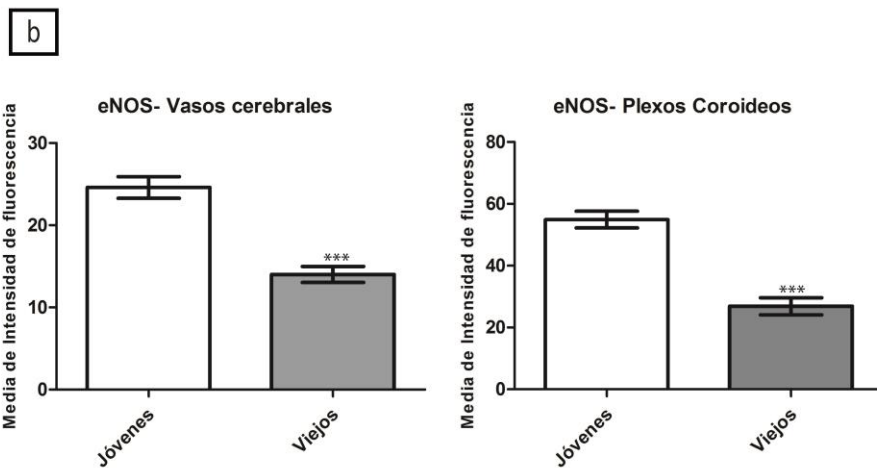
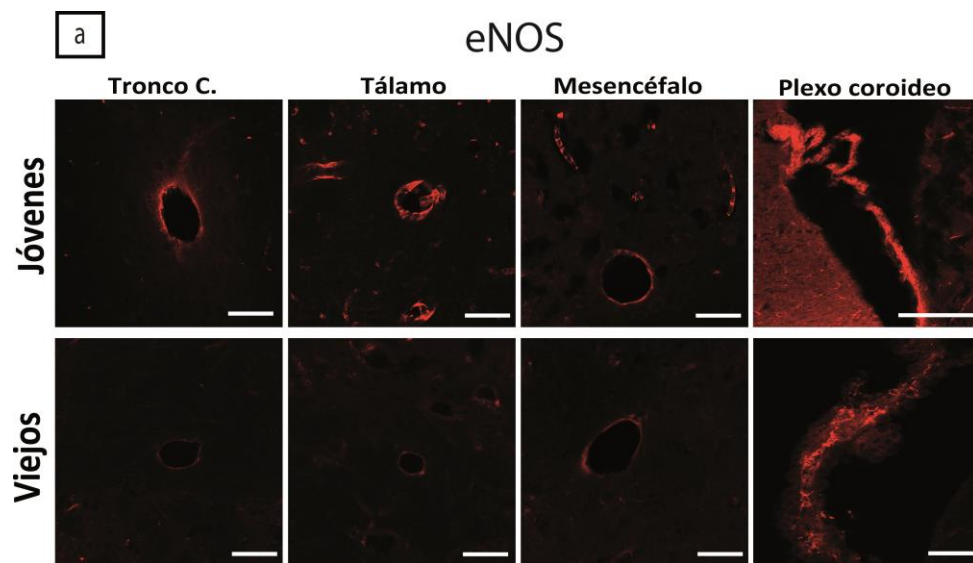


Figura 37. *Expresión de eNOS en regiones cerebrales de ratones jóvenes y viejos. (a) Imagen representativa de inmunofluorescencia de eNOS en endotelio vascular de diferentes regiones cerebrales (Tronco cerebral, tálamo, mesencéfalo y plexos coroideos). (b) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia en todas las regiones cerebrales (salvo plexos coroideos) y cuantificación de la intensidad media de fluorescencia en endotelios vasculares de plexos coroideos. (n=4 por grupo); *** p < 0.001 versus ratones jóvenes (test U de Mann–Whitney).*

Finalmente, procedimos a la cuantificación de la expresión de VEGF-A en diferentes regiones cerebrales. Se encontró una reducción significativa en la expresión relativa de ARNm de VEGF-A en todas las regiones del cerebro de ratones viejos: *fold change* de -13,76 en hipocampo, -6,25 en estriado, -4,11 en corteza, -1,92 en tálamo, -3,47 en cerebelo, -5,41 en mesencéfalo y -2,86 en tronco cerebral (Figura 38). Destaca la gran caída que sufre la expresión del VEGF-A en hipocampo, y la moderada caída de expresión que ocurre en tálamo.

Figura 38

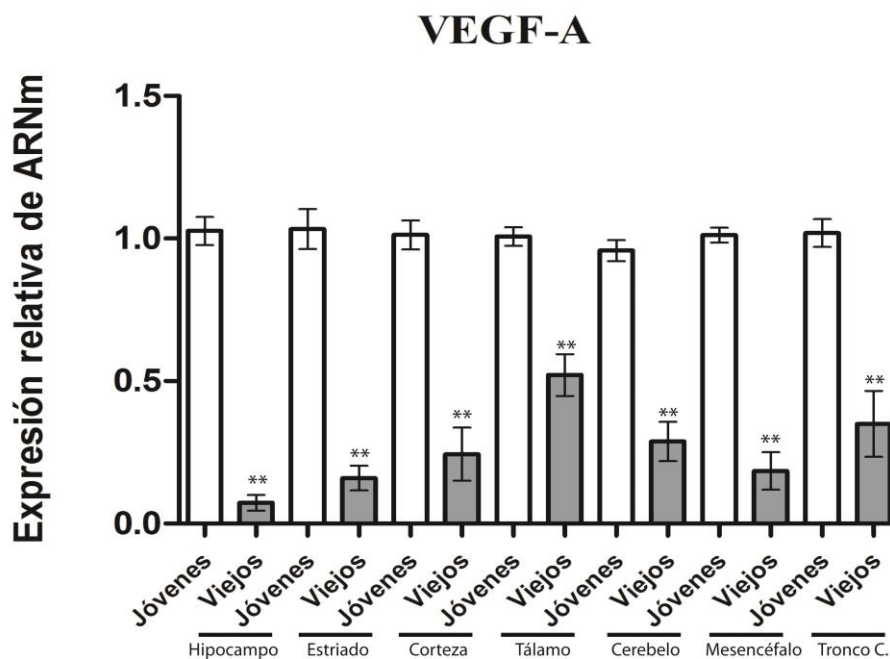


Figura 38. *Expresión relativa de ARNm de VEGF-A en regiones cerebrales de ratones viejos con respecto a ratones jóvenes. Se observa una gran caída en la expresión de ARNm de VEGF-A en todas las regiones cerebrales de ratones viejos. Como housekeeping se utilizó GAPDH, con una n= 4 por grupo. ** p < 0,01 versus ratones jóvenes (t de Student de dos colas).*

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la actualidad se está produciendo un gran aumento en el número de personas mayores en los países desarrollados. Nunca antes habíamos vivido en un entorno demográfico como el de hoy, y las tendencias continuarán hasta el punto que un 20 % de la población mundial tendrá más de 60 años en el 2050 (Kennedy y Pennypacker, 2013). Este aumento de la esperanza de vida incrementa de forma preocupante los problemas de salud asociados a la edad: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, autoinmunes, cáncer, menor resistencia a las infecciones, diabetes, etc. Aunque el envejecimiento es el principal factor de riesgo de las enfermedades prevalentes en los países desarrollados, la mala salud no es una consecuencia inevitable del envejecimiento. Por esta razón, los esfuerzos de la medicina preventiva y la geriatría van destinados a mejorar la calidad de vida. De hecho, estamos asistiendo en los últimos años a una auténtica revolución de la gerociencia, pues, si hasta hace poco tiempo se pensaba que el envejecimiento era irreversible, cada vez hay más datos a favor de lo contrario (Partridge, 2010; Lai, 2013). Esto no implica alargar la vida, sino retrasar la aparición de los efectos indeseables del envejecimiento en la medida de lo posible.

Hoy en día, nuestra comprensión de la determinación de la esperanza de vida es mucho mayor de lo que era en el pasado, pero las intervenciones administrables para la mejora de la longevidad, incluso las estrategias de terapia génica, son aún prácticamente escasas. Con el fin de mejorar la longevidad, una de las cuestiones claves que debe ser abordada es el envejecimiento. La mayoría de sus intervenciones hacen necesario la transfección en todo el cuerpo. Para cerrar la brecha entre el conocimiento de la determinación de la esperanza de vida y su transición a la práctica manipulativa, las tecnologías eficientes para la transferencia de genes juegan un papel importante. Una característica de los vectores AAV9 es, precisamente, la transducción sistémica robusta que se obtiene tras su administración intravenosa.

Nuestro objetivo principal en este estudio fue comparar el tropismo de AAV9 en órganos periféricos y en el cerebro de ratones jóvenes y viejos, así como investigar algunos mecanismos implicados que pueden ayudar a las futuras intervenciones

biogerontológicas, enfocadas a retrasar el envejecimiento y las enfermedades relacionadas.

Los resultados del presente trabajo apoyan los estudios previos sobre la capacidad de AAV9 de atravesar con éxito la vasculatura de ratones jóvenes y transducir eficientemente órganos diana periféricos (hígado, corazón y bíceps femoral) y cerebro, tras la administración intravenosa de dicho vector (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009; Brito-Armas et al 2011; Katwal et al., 2013; Schuster et al., 2014). Sin embargo es la primera vez que se ha encontrado que dicha capacidad disminuye drásticamente en ratones viejos de 22 meses.

El análisis de expresión de eGFP en órganos periféricos mostró que AAV9 transduce con una alta eficiencia tanto el endotelio como el parénquima de dichos órganos en los ratones jóvenes (Figura 16). Sin embargo, en los tejidos de ratones viejos apenas hubo expresión de eGFP en el endotelio de los órganos periféricos y, por lo tanto, muy poca expresión de eGFP en el parénquima de esos órganos (Figura 16). Cabe destacar en el tejido hepático de ratones viejos la existencia de una intensa positividad de eGFP en células de tejido linfoide (Figura 16 n). Los resultados de inmunohistoquímica de eGFP en órganos periféricos se corroboran con la cuantificación de los niveles de eGFP obtenidos por WB. Es decir, en órganos periféricos de ratones viejos observamos también una disminución drástica de eGFP, siendo más pronunciada en músculo esquelético, intermedia en corazón, y menos pronunciada en hígado (Figura 17).

Dado este novedoso dato, de un tropismo muy reducido de AAV9 en órganos periféricos de ratones viejos, decidimos llevar a cabo los estudios necesarios para comprobar qué etapa/s de AAV9 (desde su transporte hasta las de su ciclo de infección celular) podía/n estar afectada/s. En este sentido, los resultados de ARNm de eGFP indican que no hay cambios a nivel de la traducción (alta proteólisis de eGFP o alteraciones específicas en el proceso de traducción de ARNm a proteína) ya que existe una relación directa entre la reducción de la proteína eGFP y la reducción de su ARNm (Figura 18 a). Esta disminución en la expresión relativa de ARNm sigue el mismo patrón que la caída de los niveles proteicos, es decir, gran disminución en músculo, intermedia en corazón y menor en hígado.

Los resultados de incorporación de AAV9-eGFP en las células de los tejidos periféricos mostraron también una caída en ratones viejos, siguiendo el mismo patrón de disminución (Figura 18, B). Además, en ratones jóvenes la cantidad de genoma viral seguía un patrón similar de biodistribución: mayor entrada en hígado, luego en corazón y menor en músculo (Figura 18, B). Todo ello, siempre siendo mucho mayor la biodistribución de AAV9-eGFP en tejidos de ratones jóvenes que en los de ratones viejos. Estos datos apoyan otros trabajos en los que se ha estudiado el tropismo de AAV9 en ratones jóvenes, siendo muy grande en el hígado, seguido de corazón y músculo esquelético (Miyaque et al., 2011; Katwal et al., 2013).

La reducción drástica del tropismo de AAV9-eGFP encontrada en ratones viejos y el conocimiento previo de la existencia de factores en el suero con capacidad de neutralizar AAV9 (Rapti et al., 2012, Gray et al., 2013) nos llevó a estudiar si había relación entre estos dos fenómenos. No encontramos diferencias significativas en factores neutralizantes entre sueros de ratones jóvenes y viejos (Figura 19 a). Además, encontramos que los niveles de IgG frente a las proteínas de la cápsida de AAV9 eran significativamente mayores en sueros de ratones jóvenes que en sueros de viejos (Figura 19 b). Este hallazgo es debido probablemente al fenómeno de inmunosenescencia (Frasca et al., 2005) en el que la producción de IgG está disminuida en el envejecimiento.

Descartada la presencia de factores neutralizantes en el suero de ratones viejos, el siguiente paso fue estudiar el receptor primario descrito para AAV9. Datos recientes indican que los N-glicanos ligados a residuos de galactosa terminales constituyen el receptor primario de AAV9. Además, describieron que el ácido siálico puede bloquear la transducción de AAV9 (Shen et al., 2011; Bell et al., 2011). Estos estudios demostraron que la unión de AAV9 a su receptor primario se bloquea cuando la galactosa está en la penúltima posición y el ácido siálico es el residuo terminal, una configuración común que ocurre en las cadenas de glicanos. En nuestro trabajo, la hipótesis de que la progresión del envejecimiento en ratones C57BL / 6J podría modificar la distribución de galactosas o de ácidos siálicos terminales, nos hizo pensar que ello tendría efectos sobre la capacidad de AAV9-eGFP de transducir los tejidos periféricos. Los resultados del marcaje con ECL revela que en el envejecimiento se reduce la galactosilación terminal de N-glicanos de la superficie celular (incluyendo el endotelio) de forma drástica en corazón y músculo, en comparación con los

correspondientes órganos periféricos de jóvenes (Figura 20 a, b); lo que sugiere un mecanismo para la reducida eficiencia de transducción de AAV9. En el hígado estas diferencias no son muy robustas, pero una explicación potencial es que el aumento de la cantidad de N-glicanos galactosilados encontrada en el hígado, en relación con los otros órganos periféricos (Figura 20), podría explicar el mayor tropismo de AAV9 en hígado de ratones viejos y, a su vez, el aumento de la transducción hepática. Sin embargo, estos receptores no parecen ser la única vía de mediación de entrada de AAV9-eGFP en el hígado. Éste es un órgano sistémico prominente, con hepatocitos, y con una gran proporción de células que pertenecen al sistema retículo endotelial. Debido al gran volumen de sangre circulante que se filtra a través del hígado, el endotelio sinusoidal y las células linfoides desempeñan un papel importante en la absorción de diversas macromoléculas y patógenos (Smedsrod et al., 1990; Seternes et al., 2002). Esta gran capacidad de absorción muy probablemente produzca una entrada adicional de AAV9 en hígado de ratones jóvenes, independientemente del receptor primario, de ahí las diferencias de expresión del transgén observadas entre hígados de ratones jóvenes y viejos.

Estudios recientes llevados a cabo en personas de diferentes países europeos, confirmaron que con la edad se produce un aumento de glicoproteínas agalactosiladas (sin galactosa terminal) es decir, con la edad hay una tendencia al aumento de estructuras agalactosiladas unidas a núcleos de N-Acetil-Glucosamina o de Fucosa (Vanhooren et al., 2011). Además, con el envejecimiento se ha descrito un cambio en el perfil glicoproteico de IgG séricas, consistente en la sialización de galactosas terminales (Dall'Olio et al., 2013). Por lo tanto, se podría esperar que los receptores con galactosas terminales se sializasen, invirtiéndose el patrón, o que pierdan esa galactosa terminal. Pero nosotros comprobamos que en el envejecimiento sólo existe cambio de patrón a AS en el hígado, en lo que a órganos periféricos se refiere (Figura 21 a, b). Es decir, en el hígado aumentan los AS terminales. Sin embargo, éstos AS disminuyen, al igual que las galactosas terminales, en músculo esquelético y corazón (Figura 21 a, b).

Es ampliamente conocido que en el envejecimiento existe un deterioro/disfunción endotelial con: menor densidad capilar, senescencia endotelial, caída de expresión de factores angiogénicos, menor *turnover* de células endoteliales y pericitos deteriorados que desestabilizan los vasos sanguíneos (Parizkova et al., 1971; Coggan et al., 1992; Gavín et al., 2007; Lähteenvuo and Rosenzweig, 2012). A

continuación estudiamos si el envejecimiento *per se* del sistema vascular podría modificar el tropismo de AAV9. Ya que AAV9 fue inyectado por vía sanguínea, podría ocurrir que el deterioro endotelial afectara su transporte en los órganos diana periféricos. Utilizando el marcador endotelial CD31, comprobamos que existía un deterioro de los vasos sanguíneos en músculo y corazón de ratones viejos con respecto a jóvenes (Figura 22 a, b). Nuestros resultados apoyan el paradigma establecido de un fuerte deterioro vascular en ratones viejos, comprobándolo incluso con WB de CD31 en corazón y de eNOS en hígado (Figura 23 a, b). En hígado no obtuvimos cambios en la CD31, debido a que este marcador apenas se expresa en sinusoides hepáticos, detectándose solamente en vasos grandes de hígado (Sola-Gallego y Panizo, 2010). Por esta razón realizamos WB de eNOS en hígado, para comprobar también la presencia de deterioro endotelial en este órgano.

Otro mecanismo relacionado con la disfunción endotelial en el envejecimiento es la reducida capacidad de angiogénesis (Rivard et al., 1999; Swift et al., 1999). Decidimos estudiar la expresión del factor angiogénico mejor conocido, el VEGF-A. Obtuvimos una expresión disminuida tanto en hígado como en músculo de ratones viejos (Figura 24), no así en corazón, donde no hubo diferencias entre ratones jóvenes y viejos. Esto puede explicarse debido a que en algunos órganos como el corazón, el factor angiogénico descrito más determinante es el VEGF-B (Bellomo et al., 2000). Además, se ha demostrado que hay determinados tejidos, como la retina o los cardiomiocitos, que necesitan cantidades elevadas de ROS para producir angiogénesis (Ushio-Fukai and Alexander, 2004). Estas dos razones apoyan el porqué el ARNm de VEGF-A no disminuye en el corazón de ratones viejos.

En base a la descripción previa, decidimos también analizar un marcador de estrés oxidativo en órganos periféricos. Como era de esperar, en acuerdo con la gran cantidad de trabajos publicados (Zhang et al., 2011; Bouzid et al., 2014), los niveles de MDA eran mayores en todos los órganos de ratones viejos que en los de jóvenes (Figura 25), siendo incluso mayores en el corazón de ratones viejos que en músculo e hígado.

Por tanto, los resultados obtenidos permiten sugerir que el transporte vascular de AAV9 en los órganos periféricos es dependiente de los niveles de N-glicanos con galactosa terminal (receptor primario). En el envejecimiento, la caída drástica del tropismo de AAV9 en órganos periféricos puede producirse por una reducción

significativa del receptor primario asociada al deterioro endotelial y al déficit de angiogénesis.

En relación a los resultados de cerebro, en este estudio se describe por primera vez también la diferencia existente en el tropismo de AAV9 entre ratones jóvenes y viejos. En este sentido, la cantidad de expresión de eGFP en diversas regiones del cerebro, tales como, hipocampo, tálamo, cerebelo, tronco cerebral, plexos coroideos, zonas periventriculares, estriado, mesencéfalo y corteza es significativamente menor en ratones viejos (habiendo pocas células eGFP⁺ aisladas en tálamo, tronco cerebral y cerebelo) que en ratones jóvenes, como muestran los análisis inmunohistoquímicos (Figura 26 a-w). Además, en el tronco cerebral se encuentra marcaje eGFP⁺ en los tractos espinales trigeminales (Figura 26 V, W). Esto parece indicar que el virus puede experimentar transporte axonal anterógrado hacia núcleos del tronco cerebral, desde fibras sensoriales aferentes procedentes de ganglios sensitivos de la periferia (Salegio et al., 2013). Esta hipótesis es relativamente consistente con el patrón de transducción de AAV9, descrito por otros autores, en animales inyectados en la médula espinal (Zincarelli et al., 2008). También es de destacar que en los ratones jóvenes hay zonas con un marcaje más intenso, como son, las zonas periventriculares (a nivel del ventrículo lateral) y el epéndimo (Figura 26 p) o el núcleo habenular medial (Figura 26 e). Estas zonas fuertemente marcadas en torno a los ventrículos, nos hizo pensar en un posible transporte de AAV9 desde los plexos coroideos al líquido cefalorraquídeo, y desde éste se distribuye al parénquima cerebral. Esta idea es apoyada por grupos que han optado por una inyección intracisternal de AAV9, demostrando que este vector se transporta a través del líquido cefalorraquídeo hacia el parénquima cerebral (Brooke et al., 2011; Samaranch et al., 2013).

Comprobamos con dobles marcajes que el patrón de biodistribución de AAV9 es también diferente, ya que en regiones cerebrales de ratones jóvenes existen diversos tipos celulares eGFP⁺ mientras que en ratones viejos sólo se observan pocas neuronas aisladas en diferentes regiones (Figuras 27; 28; 29 a, b; 30 a, b). En ratones jóvenes se marcan células endoteliales, astrocitos, neuronas (en todas las regiones cerebrales) y también los plexos coroideos. Sin embargo, en cerebros de ratones viejos solamente apreciamos marcaje neuronal, con inmunofluorescencia, en las regiones descritas.

Los niveles proteicos medidos por WB confirman la poca cantidad de eGFP en todas las regiones cerebrales de ratones viejos, comparado con ratones jóvenes (Figura 31 a-g). Se aprecia que los niveles de eGFP en cerebelo, tanto en ratones jóvenes como en viejos, son los mayores. Sin embargo, tal y como han avanzado otros investigadores, el tropismo de AAV9 en el cerebro es menor que en los órganos periféricos, tanto en ratones jóvenes como en viejos (Bernadés de Jesús et al., 2012).

Los niveles de ARNm de eGFP, analizados mediante HIS (Figura 32 a-l) y RT-PCR (Figura 33) se complementan con los de WB de proteína (Figura 31 a-g). El descenso muy drástico de ARNm de eGFP en todas las regiones cerebrales de ratones viejos, y los resultados de RT-PCR nos indican que las cantidades relativas de ARNm en cerebelo y tronco cerebral son mayores que en otras regiones cerebrales. Esto se demuestra, además, con la cantidad de VG/ ng de tejido en las diferentes regiones cerebrales, donde se observa que la biodistribución de AAV9 en la zona posterior (cerebelo y tronco cerebral) es mayor, tanto en ratones jóvenes como en viejos, con respecto a otras zonas cerebrales (Figura 34). En distintos trabajos realizados tanto en ratones neonatos como en adultos, se observa que AAV9 administrado intravenosamente tiene un tropismo mucho mayor en zonas posteriores del cerebro, como el tronco cerebral (Foust et al., 2009, Dayton et al., 2012). Esto lo reproducimos nosotros, llegando a la misma conclusión que estos trabajos, es decir, el tropismo de AAV9 en ratones no es dependiente de la edad, si utilizamos la vía intravenosa. Sin embargo, según nuestros resultados, lo que sí cambia con la edad es el tropismo celular de AAV9. Es decir, existencia de marcaje neuronal en ratones viejos, y marcaje astrocítico y neuronal en ratones jóvenes. Foust y cols., encontraron el mismo cambio de tropismo, sólo que ellos estudiaron ratones neonatos y adultos jóvenes (Foust et al., 2009).

Con objeto de indagar en los mecanismos responsables del disminuido tropismo de AAV9 en regiones cerebrales de ratones viejos, decidimos también analizar (al igual que hicimos en los órganos periféricos) el receptor primario de AAV9 [(glicoproteína de membrana con Galactosa terminal unida de forma β (1,4) a *N*-Acetil Glucosamina)]. Encontramos que el marcaje de ECL no fue tan intenso en todo el cerebro como en los órganos periféricos, localizando sólo muy pocos vasos ECL⁺ en diferentes regiones de los cerebros de ratones jóvenes (Figura 35 c). Pero sí encontramos un fuerte marcaje con la lectina ECL en los plexos coroideos y en las células endoteliales de ratones

jóvenes, aproximadamente un 50 % más que en estas mismas zonas de ratones viejos (Figuras 35 a, b). Algunos grupos han estudiado el patrón de marcaje con ECL en ratones jóvenes y, como nosotros, no encuentran casi marcaje de ECL en cerebro (Shen et al., 2012). Tal vez, esto explique la menor entrada de AAV9 en cerebro de ratones jóvenes con respecto a los órganos periféricos. Sin embargo, existen sólo algunos vasos que permiten la entrada de AAV9 por la BHE en ratones jóvenes pero, según también nuestros hallazgos, muy posiblemente, permitan una gran entrada de AAV9, a través del plexo coroideo, hacia el líquido cefalorraquídeo. Desde aquí, AAV9 puede atravesar el epéndimo, introduciéndose así en el parénquima cerebral. Esta forma de transporte puede que ocurra en los cerebros de ratones viejos. Es decir, AAV9 entra mucho menos en los plexos coroideos de ratones viejos que en los de jóvenes (por la reducción tan grande del receptor primario). Esto hace que también pase menos AAV9 al líquido cefalorraquídeo, y desde aquí, también menos por el epéndimo (en el que también hubo una reducción de marcaje con ECL mayor del 50 % en ratones viejos) hacia el parénquima cerebral. Además, la reducción importante encontrada en el receptor primario, tanto en plexos coroideos como en epéndimo de ratones viejos, puede potenciar una menor incorporación de AAV9 al cerebro por esta vía, es decir, a través de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo. Hemos encontrado marcaje ependimario ECL⁺ sólo en tercer y cuarto ventrículo, y esto podría justificar que la entrada de AAV9 haya sido mayor en las zonas posteriores del cerebro. Por lo antes comentado, nuestros resultados aportan también una explicación al perfil de marcaje sólo neuronal (eGFP⁺ NeuN⁺) encontrado en regiones cerebrales de ratones viejos. Tampoco podemos descartar que la entrada de AAV9 haya sido mayor en motoneuronas de la médula espinal, como se ha descrito previamente (Bevan et al., 2011); pero siempre vía entrada de AAV9 por los plexos coroideos hacia el líquido cefalorraquídeo.

Como han demostrado los experimentos de Shen y cols., la cantidad de AS en cerebro de ratones jóvenes es mucho mayor que la de galactosa terminales. Nosotros describimos que, además, en ratones viejos aumenta la cantidad de AS terminal en todas las regiones cerebrales, como ejemplo, en estriado, tronco cerebral, cerebelo o plexos coroideos (Figura 36 a, b).

Otro efecto del envejecimiento en el cerebro es la disfunción endotelial (Motoji Sawabe, 2010; Ungvari et al., 2010). En el presente trabajo hemos encontrado un descenso en el marcador endotelial eNOS en todas las regiones cerebrales de ratones

viejos, incluidos los vasos de los plexos coroideos (Figura 37 a, b). También, el potente factor angiogénico VEGF-A, disminuye considerablemente en todas las regiones cerebrales (Figura 38). Esta disfunción endotelial debido al envejecimiento, puede contribuir a un transporte vascular defectuoso de AAV9 al cerebro.

Por tanto, los resultados obtenidos permiten sugerir que el transporte vascular de AAV9 en la BHE es muy poco dependiente de N-glicanos con galactosa terminal (receptor primario) en ratones jóvenes. Es posible que el co-receptor (receptor de laminina de la familia de las no integrinas) u otras moléculas aún desconocidas, puedan ser responsables de dicho transporte. Aunque en cerebro de ratones jóvenes el transporte de AAV9 vía plexos coroideos (en la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo) puede también ser importante, en el envejecimiento, esta vía de transporte de AAV9 parece ser aún mucho más significativa. La caída drástica del tropismo de AAV9 en el cerebro de ratones viejos puede producirse por una reducción significativa del receptor primario asociada al deterioro endotelial y al déficit de angiogénesis.

Viendo todos los datos en su conjunto, lo que está muy claro es que el tropismo de AAV9 disminuye drásticamente en el envejecimiento. AAV9 entra muy poco en el cerebro y en los órganos periféricos de ratones viejos, siguiendo el siguiente orden decreciente: hígado > corazón > músculo > cerebro. La clave está en el envejecimiento del sistema vascular. Es decir, el deterioro sistémico del sistema vascular implica un menor flujo sanguíneo (llegan menos partículas virales a los órganos) y una reducción en el número absoluto de receptores para AAV9 (siendo más importante el receptor primario) (Figura 39):

Figura 39

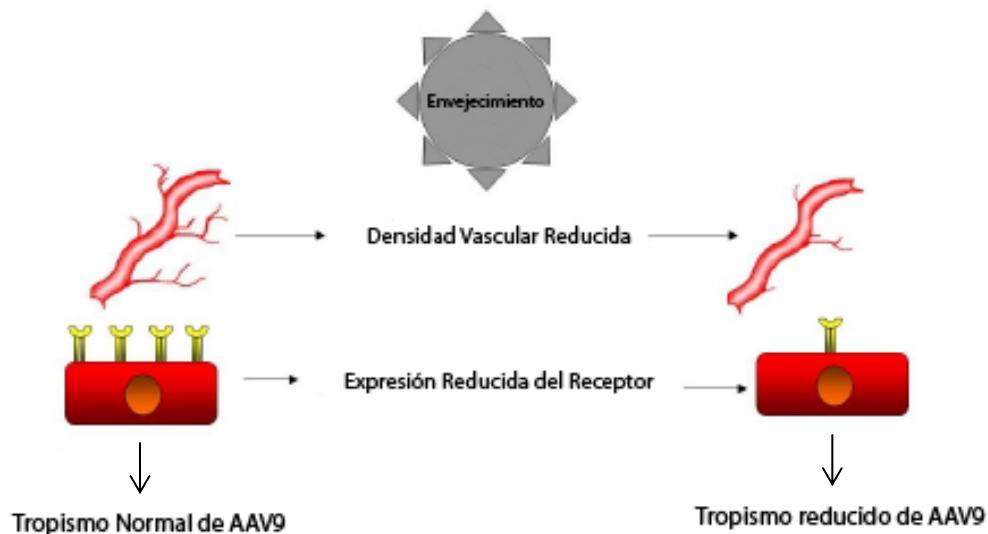


Figura 39. Esquema de la influencia del deterioro vascular sobre tropismo de AAV9 en el envejecimiento.

El deterioro vascular, según hemos comprobado con el empleo de marcadores como eNOS, CD31 o el ARNm de VEGF-A, es el causante principal de la caída del tropismo de AAV9 en el envejecimiento. Para comprobar dicha influencia, habría que realizar experimentos donde se mejoren los síntomas del deterioro vascular. Uno de los mejores restauradores del sistema vascular es el ejercicio físico, el cual produce angiogénesis independiente del envejecimiento (Arany et al., 2008; Yan et al., 2011). Tenemos también resultados previos con ratones machos viejos C57BL/6J de 22 meses, los cuales fueron sometidos a ejercicio físico aeróbico (en *Wheel-Running*) durante dos meses, antes de ser inyectados intravenosamente con AAV9-eGFP (a la misma dosis descrita en el material y métodos). Los resultados muestran un ejemplo en cerebro de localización de expresión de fibras espinales trigeminales eGFP⁺ en ratones viejos, y viejos con ejercicio (Figura 40 a). Estas fibras eGFP⁺ siguen el mismo patrón de distribución en ambos grupos. Además, se observa un aumento de fibras espinales trigeminales eGFP⁺ en ratones viejos con ejercicio, con respecto a ratones viejos (Figura 40 a). En la Figura 40 b se muestran neuronas eGFP⁺ en el mesencéfalo, a nivel de la sustancia negra, de ratones viejos con ejercicio. No se localizaron neuronas marcadas en los ratones viejos.

Figura 40

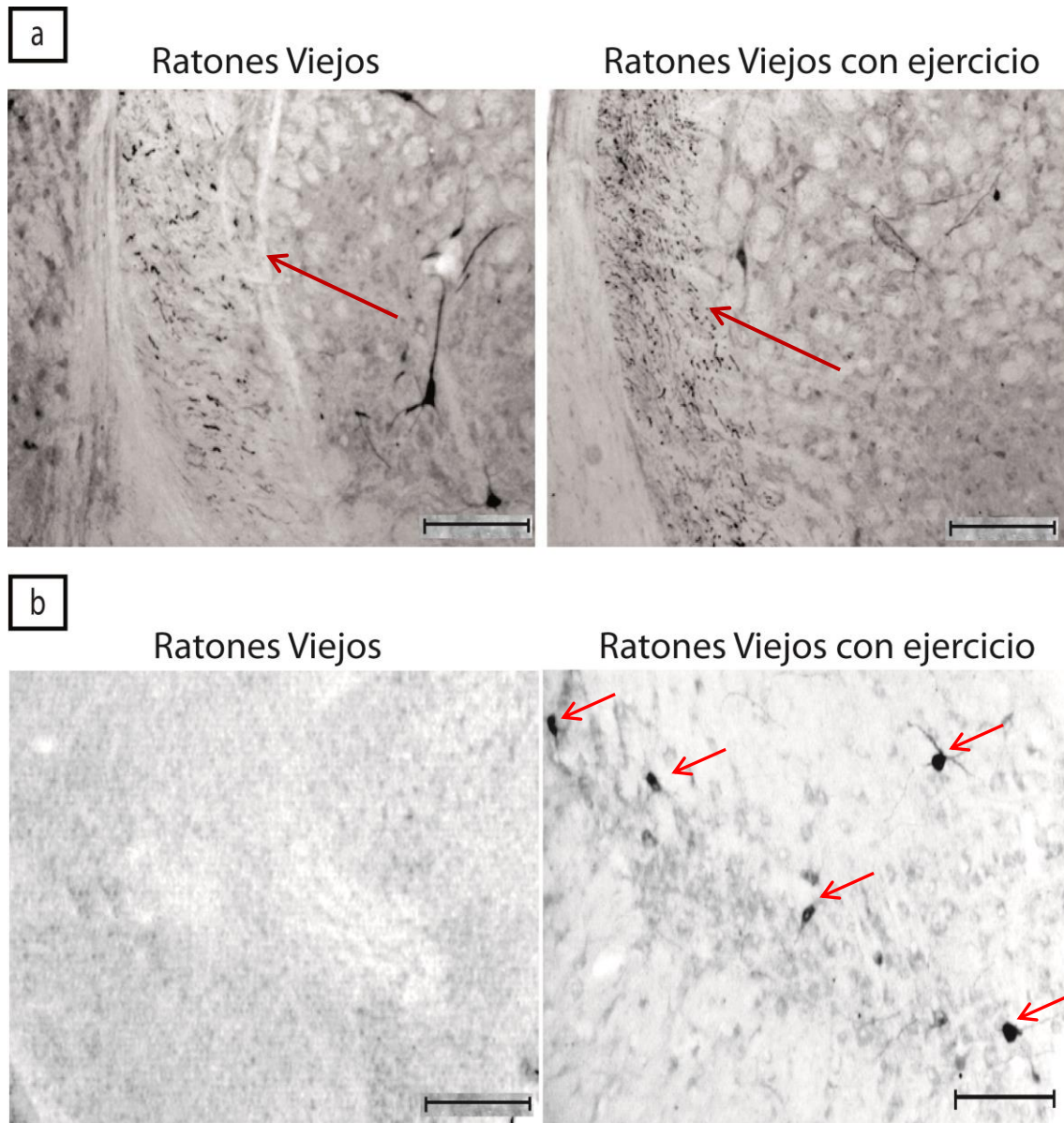


Figura 40. Inmunohistoquímica de expresión de eGFP en ratones viejos y ratones viejos con ejercicio inyectados con AAV9. (a) Microfotografía representativa de fibras espinales trigeminales de ratones viejos y viejos con ejercicio. (b) Microfotografía de mesencéfalo de un ratón viejo con ejercicio (con varias neuronas eGFP⁺), comparado con mesencéfalo de ratón viejo. Barra de escala de 500 μ m.

Otra intervención por la que se podría incrementar el tropismo de AAV9 en ratones viejos consiste en invertir el patrón aumentado de AS en viejos, utilizando la enzima Neuroaminidasa. Esta enzima corta AS terminales, exponiendo la galactosa β 1-4 unida a N-acetil-glucosamina. Este tipo de intervención ha funcionado en terapia génica con AAV9 en músculo isquémico y en transferencia génica en tejido pulmonar

(Bell et al., 2011; Katwal et al., 2013). Aprovechando el aumento de AS encontrado en nuestro trabajo en cerebro e hígado, se podría emplear esta enzima para aumentar el tropismo de AAV9 en el envejecimiento.

Como hemos visto, algunos cambios fisiológicos que aparecen en el envejecimiento, como el deterioro vascular, producen efectos negativos a la hora de realizar terapia génica en una intervención biogerontológica. Sin embargo, hemos contribuido a sentar algunas bases a los problemas reales que pueden surgir para intervenir en el envejecimiento. Y más aún, a problemas que se pasan por alto cuando se investiga en enfermedades asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. Hemos comentado que el envejecimiento es el factor de riesgo clave para la mayoría de enfermedades crónicas. Dado que durante esta etapa de la vida se producen cambios que pueden afectar tanto a la enfermedad en sí, como a la eficacia de un posible tratamiento, es necesario realizar más estudios enfocados a mejorar la seguridad, eficiencia y optimización de una intervención biogerontológica molecular. Al actuar modificando el envejecimiento podríamos de forma global abordar diversas enfermedades crónicas asociadas a este proceso y ampliar así la vida útil. Hasta ahora el tratamiento de las mismas se había hecho de manera individual, por lo que las investigaciones realizadas hasta el momento han tenido mayormente un enfoque específico; pero al abordarlas desde su raíz (el envejecimiento), simplificaríamos el tratamiento, reduciendo la sobremedicación y abaratando también costes sanitarios. La influencia de la edad sobre la transducción sistémica de AAV9 abre nuevas perspectivas sobre el mecanismo subyacente y/o las barreras que limitan la eficiencia de la transferencia sistémica de genes mediada por este vector.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El tropismo de AAV9 inyectado por vía intravenosa disminuye drásticamente en diferentes regiones cerebrales (tronco cerebral, cerebelo, mesencéfalo, corteza, estriado, tálamo e hipocampo) y en órganos diana periféricos (bíceps femoral, corazón e hígado) de ratones C57BL/6J viejos con respecto a ratones jóvenes.
- 2) La reducción drástica del tropismo de AAV9 en órganos periféricos de ratones viejos no se traduce en un cambio en el perfil de biodistribución periférica de AAV9 con respecto a ratones jóvenes. Es decir, independientemente de la edad del animal, el tropismo de AAV9 es mayor en hígado, seguido de corazón y, finalmente, en bíceps femoral.
- 3) El tropismo de AAV9 inyectado intravenosamente es mayor en las regiones posteriores del cerebro (cerebelo y tronco cerebral).
- 4) El tropismo celular de AAV9 a nivel cerebral pasa de ser astrocítico y neuronal en ratones jóvenes a ser sólo neuronal en ratones viejos.
- 5) En suero de ratones viejos no hay factores neutralizantes de AAV9 ni mayor producción de IgG anti-AAV9, en comparación con ratones jóvenes, responsables del menor tropismo del vector.
- 6) En el envejecimiento fisiológico se produce una reducción del receptor primario de AAV9 [Galactosa $\beta(1-4)$ terminales unidos a N-acetil-glucosamina] en los vasos de los órganos periféricos.
- 7) La reducción del receptor primario de AAV9 en los vasos de órganos periféricos de ratones viejos no se traduce en un cambio en el perfil de distribución periférica de Galactosa $\beta(1-4)$ terminales unidos a N-acetil-glucosamina, con respecto a ratones jóvenes. Es decir, independientemente de la edad del animal, y en correlación con la biodistribución de AAV9 en los órganos periféricos, los niveles de receptor primario de AAV9 son también mayores en hígado, seguido de corazón y, finalmente, en bíceps femoral.

- 8) El transporte vascular de AAV9 en los órganos periféricos es dependiente de los niveles de N-glicanos con galactosa terminal (receptor primario).
- 9) En el envejecimiento fisiológico se produce una reducción del receptor primario de AAV9 [Galactosa $\beta(1-4)$ terminales unidos a N-acetil-glucosamina] en el cerebro, fundamentalmente en plexos coroideos (vasos y células epiteliales), y en epéndimo del tercer y cuarto ventrículo. Aunque en los vasos cerebrales se produce también una reducción del receptor primario de AAV9, ésta no se considera relevante, al haberse detectado en todo el cerebro de ratones jóvenes muy pocos vasos ECL⁺ que expresan N-glicanos con galactosa terminal.
- 10) En ratones jóvenes, el transporte vascular de AAV9 en la BHE es muy poco dependiente de N-glicanos con galactosa terminal. Aunque en cerebro de ratones jóvenes el transporte de AAV9 vía plexos coroideos (en la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo) puede ser importante, en el envejecimiento, esta vía de transporte de AAV9 parece ser aún mucho más significativa.
- 11) En el envejecimiento fisiológico se produce en el cerebro y en el hígado un aumento significativo en la sialización de glicoproteínas de membrana (N-glicanos tipo ácido siálico $\alpha 2,3$ -N-GlcNAc) con respecto a los ratones jóvenes. Sin embargo, en bíceps femoral y corazón, hay una reducción de este tipo de N-glicanos.
- 12) La disminución del receptor primario de AAV9 asociada a la disfunción endotelial propia del envejecimiento fisiológico produce un déficit en el transporte vascular de AAV9, a nivel cerebral y en órganos periféricos, con consecuencias en diferentes etapas del ciclo de infección celular viral (transcripción y traducción reducida de eGFP) en tales órganos.
- 13) Los resultados obtenidos permiten abordar diferentes estrategias de intervención enfocadas a incrementar el transporte vascular y el tropismo tisular de AAV9 en el envejecimiento fisiológico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 25(1): 5-23 (2005).
- Abbott NJ, Ronnback L y Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7(1): 41-53 (2006).
- Adler A, Messina E, Sherman B, et al. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(3): 1015–1022 (2003).
- Ahn CH, Chae SY, Bae YH y Kim SW. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release* 80(1-3): 273–282 (2002).
- Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H y Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol.* 80(19): 9831–9836 (2006).
- Alavez S, Vantipalli MC, Zucker DJ, Klang IM y Lithgow GJ. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature* 472(7342): 226–229 (2011).
- Alba R, Bosch A y Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12(Suppl1): S18-27 (2005).
- Alvarez VA y Sabatini BL. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 30: 79-97 (2007).
- Arany Z, Foo S, Ma Y, Ruas J, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala S, Baek K, Rosenzweig A y Spiegelman B. Hif-independent regulation of vegf and angiogenesis by the transcriptional coactivator pgc-1alpha. *Nature* 451(7181): 1008–1012 (2008).
- Arenas IA, Xu Y y Davidge ST. Age-associated impairment in vasorelaxation to fluid shear stress in the female vasculature is improved by TNF-alpha antagonism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(3): 1259 –1263 (2006).
- Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA y Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet.* 85(6): 823–832 (2009).
- Armanios M y Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet.* 13(10): 693–704 (2012).
- Austad SN. Why We Age: What Science Is Discovering about the Body's Journey through Life. *John Wiley & Sons, New York* (1997).

- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P y Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429(6990): 413-417 (2004).
- Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttil RA, Dolle ME, Calder RB, Chisholm GB, Pollock BH, Klein CA, et al. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 441(7096): 1011–1014 (2006).
- Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH y Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 61(6): 1315–1322 (2012).
- Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A y Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 11(1): 35–46 (2010).
- Bell CL, Vandenberghe LH, Bell P, Limberis MP, Gao GP, Van Vliet K, Agbandje-McKenna M y Wilson JM. The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J Clin Invest.* 121(6): 2427-2435 (2011).
- Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 86(2): E29-35 (2000).
- Benigni A, Orisio S, Noris M, Iatropoulos P, Castaldi D, Kamide K, Rakugi H, Arai Y, et al. Variations of the angiotensin II type 1 receptor gene are associated with extreme human longevity. *Age (Dordrecht)* 35(3): 993-1005 (2012).
- Bernardés de Jesús B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F y Blasco MA. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med.* 4(8): 691–704 (2012).
- Berzlanovich A. M., Keil W., Waldhoer T., Sim E., Fasching P. y Fazeny-Dorner B. Do centenarians die healthy? An autopsy study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60(7): 862-865 (2005).
- Bevan AK, Duque S, Foust KD, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther.* 19(11): 1971-1980 (2011).
- Bickel U, Yoshikawa T y Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 46(1-3): 247-279 (2001).
- Blackburn EH, Greider CW y Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 12(10): 1133–1138 (2006).

- Blagosklonny MV. Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle* 10(24): 4217–4224 (2011).
- Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller AD y Chamberlain JS. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adenoassociated virus serotype 6. *Mol Ther.* 10(4): 671-678 (2004).
- Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 3(10): 640–649 (2007).
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S y Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349): 349–352 (1998).
- Boonekamp JJ, Simons MJ, Hemerik L y Verhulst S. Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell.* 12(2): 330–332 (2013).
- Borenstein R, Singer O, Moseri A y Frenkel N. Use of amplicon-6 vectors derived from human herpesvirus 6 for efficient expression of membrane-associated and -secreted proteins in T cells. *J Virol.* 78(9): 4730-4743 (2004).
- Boulias K y Horvitz HR. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab.* 15(4): 439–450 (2012).
- Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S y Fabre C. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. *PLoS One.* 9(3): e90420 (2014).
- Bowen RL y Atwood CS. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology* 50 (5): 265-90 (2004).
- Brito-Armas JM, Castro-Hernandez J, Rodriguez-Diaz M y Castro-Fuentes R. Terapia genica no invasiva en enfermedades neurologicas. *Rev Neurol.* 52(10): 603-17 (2011).
- Bruunsgaard H, Pedersen M y Pedersen B K. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.* 8(3): 131-136 (2001).
- Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M y Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol.* 121(2): 255–260 (2000).
- Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ y 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.* 10(2): 302-317 (2004).

- Burtner CR y Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(8): 567–578 (2010).
- Cabanillas R, Cadinanos J, Villameytide JA, Perez M, Longo J, Richard JM, Alvarez R, Duran NS, Illan R y Gonzalez DJ. Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *Am J Med Genet A.* 155A(11): 2617–2625 (2011).
- Calamini B, Silva MC, Madoux F, Hutt DM, Khanna S, Chalfant MA, Saldanha SA, Hodder P, Tait BD, Garza D, et al. Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nat Chem Biol.* 8(2): 185–196 (2012).
- Calderwood SK, Murshid A y Prince T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* 55(5): 550–558 (2009).
- Campisi J y d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(9): 729–740 (2007).
- Carter PJ y Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med.* 6(1): 17-27 (2000).
- Cearley CN, Vandenberghe LH, Parente MK, Carnish ER, Wilson JM y Wolfe JH. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol Ther.* 16(10): 1710-1718 (2008).
- 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.* 13(3): 528-537 (2006).
- Centlivre M, Zhou X, Pouw SM, Weijer K, Kleibeuker W, Das AT, Blom B, Seppen J, Berkhout B y Legrand N. Autoregulatory lentiviral vectors allow multiple cycles of doxycycline-inducible gene expression in human hematopoietic cells in vivo. *Gene Therapy* 17(1), 14–25 (2010).
- Charchat-Fichman H, Caramelli P, Sameshima K y Nitrini R. Decline of cognitive capacity during aging. *Rev Bras Psiquiatr.* 27(1): 79-82 (2005).
- Chiang WC, Ching TT, Lee HC, Mousigian C y Hsu AL. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell* 148(1-2): 322–334 (2012).
- Chiorini JA, Kim F, Yang L y Kotin RM. Cloning and characterization of adenoassociated virus type 5. *J Virol.* 73(2): 1309–1319 (1999).
- Chomczynski P y Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 1(2): 581-585 (2006).

- Coggan A, Spina R, King D, Rogers M, Brown M, Nemeth P y Holloszy J. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol.* 72(5): 1780–1786 (1992).
- Collado M, Blasco MA y Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130(2): 223–233 (2007).
- Coles LS. Demographics of human supercentenarians and the implications for longevity medicine. *Ann N Y Acad Sci.* 1019: 490-495 (2004).
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325(5937): 201–204 (2009).
- Comfort A. Ageing: The Biology of Senescence. *Routledge & Kegan Paul, London* (1964).
- Connolly JB. Lentiviruses in general therapy research. *Gene Ther.* 9(24): 1730-1734 (2002).
- Conwell CC y Huang L. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv Genet.* 53PA: 1-18 (2005).
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6(12): 2853–2868 (2008).
- Craik FIM y Salthouse TA. Handbook of Aging and Cognition. *Erlbaum, Hillsdale* (1992).
- Crespo D, Megias M, Fernandez-Viadero C, Alonso L y Verduga R. The neurosecretory system is hypertrophied in senescence-accelerated mice. *Rejuvenation Res.* 9(2): 297-301 (2006).
- Crespo D, Villegas J, Fernández-Viadero C, Ovejero V, Amodia J y Verduga R. The influence of age on supraoptic nucleus glial cells of the mouse. *Mech Ageing Dev.* 75(2): 131-40 (1994).
- Crystal RG. Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. *Hum Gene Ther.* 25(1): 3-11 (2014).
- Csiszar A, Labinskyy N, Orosz Z, Xiangmin Z, Buffenstein R y Ungvari Z. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Am J Physiol.* 293(2): 919–927 (2007a).
- Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, Rivera A, Orosz Z y Ungvari Z. Vasculoprotective effects of anti-TNF α treatment in aging. *Am J Pathol.* 170(1): 388–698 (2007b).

- Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 90(11): 1159 – 1166 (2002).
- Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol Genomics* 17(1): 21–30 (2004).
- Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K y Auwerx J. Sirtuins: the ‘magnificent seven’, function, metabolism and longevity. *Annals of Medicine* 39(5), 335–345 (2007).
- Dall’Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M y Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing Res Rev.* 12(2): 685-698 (2013).
- Dayton RD, Wang DB y Klein RL. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin Biol Ther.* 12(6): 757–766 (2012).
- Deelen J, Uh HW, Monajemi R, van Heemst D, Thijssen PE, Bohringer S, van den Akker EB, de Craen AJ, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, et al. Gene set analysis of GWAS data for human longevity highlights the relevance of the insulin/IGF-1 signaling and telomere maintenance pathways. *Age (Dordrecht)* 35(1): 235-49 (2011).
- De Grey AD, Ames BN, Andersen JK, Bartke A, Campisi J, Heward CB, McCarter RJ y Stock G. Time to talk SENS: critiquing the immutability of human aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 959: 452–462 (2002).
- De Magalhaes JP, Curado J y Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics.* 25(7): 875–881 (2009).
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A y Le Merrer M. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300(5628): 2055 (2003).
- Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L y Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22(7): 832–853 (2008).
- Deschenes MR. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Med.* 34(12): 809-824 (2004).
- Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A y Chiorini J. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med.* 9(10): 1306-1312 (2003).

- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(20): 9363–9367 (1995).
- Ding W, Zhang L, Yan Z y Engelhardt JF. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 12(11): 873-880 (2005).
- Doherty TJ. Physiology of aging: Invited review: aging and sarcopenia. *J Appl Physiol.* 95(4): 1717-1727 (2003).
- Doherty TJ, Vandervoort AA y Brown WF. Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Can J Appl Physiol.* 18(4): 331-358 (1993).
- Doles J, Storer M, Cozzuto L, Roma G y Keyes WM. Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev.* 26(19): 2144–2153 (2012).
- Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 100(11): 1659–1666 (2007).
- Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren JR y Gems D. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 22(23): 3236–3241 (2008).
- Dos Santos R y Beyer-Nardi N. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genet. Mol. Biol.* 31(1): 1-11 (2008).
- Dowd E, Monville C, Torres EM, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND y Dunnett SB. Lentivector-mediated delivery of GDNF protects complex motor functions relevant to human Parkinsonism in a rat lesion model. *Eur J Neurosci.* 22(10): 2587-2595 (2005).
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J y Engelhardt JF. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest.* 105(11): 1573-1587 (2000).
- Dullaers M y Thielemans K. From pathogen to medicine: HIV-1 derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy. *J Gene Med.* 8(1): 3-17 (2006).
- Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, Fyfe J, Moullier P, Colle MA y Barkats M. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther.* 17(7): 1187-1196 (2009).
- Durieux J, Wolff S y Dillin A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* 144(1): 79–91 (2011).

- Edgar D, Shabalina I, Camara Y, Wredenberg A, Calvaruso MA, Nijtmans L, Nedergaard J, Cannon B, Larsson NG y Trifunovic A. Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab.* 10(2): 131–138 (2009).
- Ehrhardt A, Engler JA, Xu H, Cherry AM y Kay MA. Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration. *Human Gene Therapy* 17(11), 1077–1094 (2006).
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Buttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* 11(11): 1305–1314 (2009).
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY y Berglund P. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423(6937): 293–298 (2003).
- Evans W. Functional and metabolic consequences of sarcopenia. *J Nutr.* 127(5 Suppl): 998S-1003S (1997).
- Finch C. E. Longevity, Senescence, and the Genome. *The University of Chicago Press, Chicago and London* (1990).
- Fjell AM y Walhovd KB. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci.* 21(3): 187-221 (2010).
- Flotte TR y Carter B. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 2(1): 357-362 (1995).
- Fontana L, Partridge L y Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328(5976): 321–326 (2010).
- Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM y Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.* 27(1): 59-65 (2009).
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E y De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908: 244-254 (2000).
- Francia P, delli Gatti C, Bachschmid M, et al. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* 110(18): 2889–2895 (2004).
- Frasca D, Riley RL y Blomberg BB. Humoral immune response and B-cell functions including immunoglobulin class switch are downregulated in aged mice and humans. *Semin Immunol.* 17(5): 378-84 (2005).
- Fratiglioni L, Mangialasche F y Qiu C. Brain aging: lessons from community studies. *Nutr Rev.* 68(2): 119-27 (2010).

- Friedman DB y Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118(1), 75–86 (1988).
- Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG y Evans WJ. Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol.* 64(3): 1038-1044 (1988).
- Frontera WR, Suh D, Krivickas LS, Hughes VA, Goldstein R y Roubenhoff R. Skeletal muscle fibre quality in older men and women. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(3): 611-618 (2000).
- Gao G, Alvira M, Wang L, Calcedo R, Johnston J y Wilson J. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene. *Therapy Proc Natl Acad Sci USA.* 99(18): 11854–11859 (2002).
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X y Wilson JM. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 78(12): 6381–6388 (2004).
- Gao G, Vandenberghe LH y Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 5(3): 285-297 (2005).
- Gavin TP, Ruster RS, Carrithers JA, Zwetsloot KA, Kraus RM, Evans CA, Knapp DJ, Drew JL, McCartney JS, Garry JP y Hickner RC. No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *The Journal of Physiology* 585(Pt 1): 231–239 (2007).
- Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, Lamon S, Russell AP, Davies KE, Febbraio MA, et al. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484(7394): 394–398 (2012).
- Giralt A y Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J.* 444(1): 1–10 (2012).
- Goldman DP, Cutler D, Rowe JW, Michaud PC, Sullivan J, Peneva D y Olshansky SJ. Substantial health and economic returns from delayed aging may warrant a new focus for medical research. *Health Aff. (Millwood)* 32(10): 1698–1705 (2013).
- Gonçalves MAFV. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* 2: 43-59 (2005).
- Grammas P, Martinez J y Miller B. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med.* 13: e19 (2011).

- Gray SJ, Nagabhushan Kalburgi S, McCown TJ y Jude Samulski R. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther.* 20(4): 450-459 (2013).
- Green DR, Galluzzi L y Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333(6046): 1109–1112 (2011).
- Gudmundsson H, Gudbjartsson DF, Frigge M, Gulcher JR y Stefánsson K. Inheritance of human longevity in Iceland. *European Journal of Human Genetics* 8(10): 743–749 (2000).
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D y Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37(2): 529–534 (2001).
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3): 298-300 (1956).
- Harman D. The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *J Gerontol.* 20: 151–153 (1965).
- Harris KM, Fiala JC y Ostroff L. Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1432): 745-748 (2003).
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460(7253): 392–395 (2009).
- Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM, Yaghootkar H, Dutta A, Murray A, Frayling TM, et al. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell.* 10(5): 868–878 (2011).
- Hartl FU, Bracher A y Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475(7356): 324–332 (2011).
- Hayflick L y Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25: 585–621 (1961).
- Hayflick L. *How and Why We Age.* Ballantine Books, New York (1994).
- Hekimi S, Lapointe J y Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21(10): 569–576 (2011).
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen T, Harvald B y Vaupel JW. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900. *Human Genetics* 97(3): 319–323 (1996).

- Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, Pamplona R, Seo AY, Hofer T, Someya S, Miyakawa T, Nakayama C, Samhan-Arias AK, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS ONE* 5(7): e11468 (2010).
- Hjelmborg JB, Iachine I, Skytthe A, Vaupel JW, McGue M, Koskenvuo M, Kaprio J, Pedersen NL y Christensen K. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Human Genetics* 119(3): 312–321 (2006).
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 361(15): 1475–1485 (2009).
- Hong MG, Myers AJ, Magnusson PK y Prince JA. Transcriptome-wide assessment of human brain and lymphocyte senescence. *PLoS One* 3(8): e3024 (2008).
- Hsu AL, Murphy CT y Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heatshock factor. *Science* 300(5622): 1142–1145 (2003).
- Hufnagel RB, Ahmed ZM, Correa ZM y Sisk RA. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 250(8): 1117–1128 (2012).
- Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U, et al. Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic endothelial progenitor cells by IGF-1 receptor-dependent signaling. *Mol Med.* 14(5-6): 301–308 (2008).
- Tros de Ilarduya C. Vectores no virales en Terapia Génica. *Terapia Génica: ¿Memoria o Esperanza?* Ed. Complutense. 34-45 (2008).
- Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA y Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* 14(1): 45-53 (2006).
- Isaac JT, Ashby MC y McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron.* 54(6): 859-71 (2007).
- Ito A, Shinkai M, Hakamada K, Honda H y Kobayashi T. Radiation-inducible TNF-alpha gene expression under stress-inducible promoter gadd 153 for cancer therapy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(6): 598–601 (2001).
- Jablonski KL, Seals DR, Eskurza I, Monahan KD y Donato AJ. Highdose ascorbic acid infusion abolishes chronic vasoconstriction and restores resting leg blood flow in healthy older men. *J Appl Physiol.* 103(5): 1715–1721 (2007).
- Jakobsson J y Lundber C. Lentiviral vector for use in the central nervous system. *Mol Ther.* 13(3): 484-491 (2006).
- Janas J, Skowronski J y Van Aelst L. Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons. *Meth Enzymol.* 406: 593-605 (2006).

- Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469(7328): 102–106 (2011).
- Jeck WR, Siebold AP y Sharpless NE. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell*. 11(5): 727–731 (2012).
- Jolly RD, Douglas BV, Davey PM y Roiri JE. Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 41(2): 283-295 (1995).
- Jones DL y Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol*. 13(5): 506–512 (2011).
- Jung T, Bader N y Grune T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci*. 1119: 97-111 (2007).
- Kamen G y Gabriel DA. Essentials of Electromyography. *Human Kinetics, Champagne, IL* (2010).
- Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D y Doring MJ. Safety and tolerability of gene therapy with an adenoassociated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369(9579): 2097-2105 (2007).
- Karow M y Calos MP. The therapeutic potential of Φ C31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opinion on Biological Therapy* 11(10): 1287–1296 (2011).
- Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD y Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301(5634): 839-842 (2003).
- Katwal AB, Konkalmatt PR, Piras BA, Hazarika S, Li SS, John Lye R, Sanders JM, Ferrante EA, Yan Z, Annex BH y French BA. Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther*. 20(9): 930-938 (2013).
- Kazak L, Reyes A y Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(10): 659–671 (2012).
- Kennedy B y Pennypacker J. Drugs that modulate aging: the promising yet difficult path a head. *Translational Research* 163(5): 456-465 (2013).
- Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* 464(7288): 504–512 (2010).
- Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, van Orsouw NJ, Zhang X, Collier HA, Perls TT, Upton M, Vijg J y Wei JY. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res*. 27(11): 2434–2441 (1999).

- Kim S, Bi X, Czarny-Ratajczak M, Dai J, Welsh DA, Myers L, Welsch MA, Cherry, KE, Arnold J, Poon LW y Jazwinski SM. Telomere maintenance genes SIRT1 and XRCC6 impact age-related decline in telomere length but only SIRT1 is associated with human longevity. *Biogerontology* 13(2), 119–131 (2012).
- Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W y Wagner E. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *Journal of Gene Medicine* 1(2), 111–120 (1999).
- Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM y Henning PP. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther.* 16(1): 89–96 (2008).
- Kobayashi N, Arata T, Okitsu T, Ikeda H, Kobayashi K, Kosaka Y, Narushima M, Tanaka N y Lakey JR. Transduction of human islets with the lentiviral vector. *Transplant Proc.* 36(7): 2203-2204 (2004).
- Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE y Wilson JM. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 15(2): 211-219 (2004).
- Koga H, Kaushik S y Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 10(2): 205–215 (2011).
- Kootstra NA, Matsumura R y Verma IM. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. *Mol Ther.* 7(5 Pt 1): 623-631 (2003).
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L y Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 114(9): 1299–1307 (2004).
- Kroemer G, Galluzzi L y Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87(1): 99–163 (2007).
- Kruegel U, Robison B, Dange T, Kahlert G, Delaney JR, Kotireddy S, Tsuchiya M, Tsuchiyama S, Murakami CJ, Schleit J, et al. Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 7(9): e1002253 (2011).
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ y Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24(22): 2463–2479 (2010).
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R y Jobling WA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309(5733): 481–484 (2005).
- Lachmann RH. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Current Opinion in Pediatrics* 23(6): 588–593 (2011).

- Lähteen vu o J y Rosenzweig A. Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res.* 110(9): 1252-1264 (2012).
- Lai WF. Delivery of therapeutics: current status and its relevance to regenerative innovations. *Recent Patents on Nanomedicine* 1: 7–18 (2011a).
- Lai WF. In vivo nucleic acid delivery with PEI and its derivatives: current status and perspectives. *Expert Review of Medical Devices* 8(2): 173–185 (2011b).
- Lai WF. Nucleic acid delivery: Roles in biogerontological interventions. *Ageing Res Rev.* 12(1): 310-315 (2013).
- Lai WF y Lin MC. Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 134(3): 158–168 (2009).
- Landis JN y Murphy CT. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Developmental Dynamics* 239(5): 1405–1412 (2010).
- Laplante M y Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274–293 (2012).
- Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, Tilstra JS, Feldman CH, Robbins PD, Niedernhofer LJ, et al. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun.* 3: 608 (2012).
- Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, Gartner C, Dimova N, Hanna J, Gygi SP, et al. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467(7312): 179–184 (2010).
- Lee H y Jeong JH. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J Control Release* 79(1-3): 283-91 (2002).
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW y Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(9): 3374–3379 (2008).
- Lever AM, Strappe PM y Zhao J. Lentiviral vectors. *J Biomed Sci.* 11(4): 439-449 (2004).
- Li S, Kimura E, Fall BM, Reyes M, Angello JC, Welikson R, Hauschka SD y Chamberlain JS. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther.* 12(14): 1099-1108 (2005).
- Li T, Lan JQ y Boison D. Uncoupling of astrogliosis from epileptogenesis in adenosine kinase (ADK) transgenic mice. *Neuron Glia Biol.* 4(2): 91-9 (2008).

- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T y Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1(8639): 642–645 (1989).
- Lipshutz GS, Gruber CA, Cao Y, Hardy J, Contag CH y Gaensler KM. In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. *Mol Ther.* 3(3): 284–292 (2001).
- Liras A y Olmedillas S. Conceptos generales de Terapia génica. *Terapia Génica: ¿Memoria o Esperanza?* Ed. Complutense. 1-12 (2008).
- Liu G, Rogers J, Murphy CT y Rongo C. EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *EMBO J.* 30(15): 2990–3003 (2011a).
- Liu J, Skjorringe T, Gjetting T y Jensen TG. PhiC31 integrase induces a DNA damage response and chromosomal rearrangements in human adult fibroblasts. *BMC Biotechnology* 9, 31 (2009).
- Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks GJ, Kennerdell JR, Zhu Y, Wang LS y Bonini NM. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 482(7386): 519–523 (2012).
- Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol.* 27(24): 8807–8814 (2007).
- López-Otín C., Maria A. Blasco, Partridge L, Serrano M y Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 153(6): 1194–1217 (2013).
- Lord CJ y Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481(7381): 287–294 (2012).
- Lowenstein PR. Crossing the rubicon. *Nat Biotechnol.* 27(1): 42-44 (2009).
- Lundstrom K y Boulikas T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat.* 2 (5): 471-486 (2003).
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T y Gopferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60(2): 247–266 (2005).
- Luo D y Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol.* 18(8): 893-895 (2000).
- Mahato RI, Smith LC y Rolland A. Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. *Adv Genet.* 41: 95-156 (1999).

- Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW y Bartus RT. Safety and tolerability of intraputaminally delivered adeno-associated virus serotype 2-neurturin to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 7(5): 400-408 (2008).
- Martin GM. The biology of aging: 1985-2010 and beyond. *FASEB J.* 25(11): 3756-3762 (2011).
- Martínez DE. Mortality patterns suggest lack of senescence in Hydra. *Exp. Gerontol.* 33(10): 217-225 (1998).
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R y Terry RD. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* 43(1): 192-197 (1993).
- Mathias NR y Hussain MA. Non-invasive systemic drug delivery: developability considerations for alternate routes of administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(1): 1-20 (2000).
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489(7415): 318-321 (2012).
- Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1144: 97-112 (2008).
- Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H y Benno Y. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS ONE* 6(8): e23652 (2011).
- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP y Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res.* 89(9): 793-798 (2001).
- McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J y Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Ther.* 16(11): 1340-1352 (2009).
- Merdan T, Kopecek J y Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(5): 715-758 (2002).
- Mesquita A, Weinberger M, Silva A, Sampaio-Marques B, Almeida B, Leao C, Costa V, Rodrigues F, Burhans WC y Ludovico P. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(34): 15123-15128 (2010).

- Miles EA, Rees D, Banerjee T, et al. Age-related increases in circulating inflammatory markers in men are independent of BMI, blood pressure and blood lipid concentrations. *Atherosclerosis* 196(1): 298–305 (2008).
- Miller RA. Genes against aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67(5): 495–502 (2012).
- Min JN, Whaley RA, Sharpless NE, Lockyer P, Portbury AL y Patterson C. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol.* 28(12): 4018–4025 (2008).
- Mingozi F y High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther.* 7(5): 316-324 (2007).
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM y Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. *Nature* 451(7182): 1069–1075 (2008).
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A y Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 29(24-25): 3477–3496 (2008).
- Morris JZ, Tissenbaum HA y Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382(6591): 536–539 (1996).
- Morrow G, Samson M, Michaud S y Tanguay RM. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J.* 18(3): 598–599 (2004).
- Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H y Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 12(2): 661-684 (2012).
- Mrak RE, Griffin ST y Graham DI. Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(12): 1269-75 (1997).
- Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y y Shimada T. Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single stranded AAV vectors. *Brain Res.* 1389: 19-26 (2011).
- Myers MW, Laughlin CA, Jay FT y Carter BJ. Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperaturesensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *J Virol.* 35(1): 65-75 (1980).
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 15(3): 331-337 (2009).

- Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y y Kay MA. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol.* 79(1): 214-224 (2005).
- Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet.* 12(5): 301-315 (2011).
- Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P, Condorelli M, Sica G, De Rosa G y Pelicci P. Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 2112–2116 (2003).
- Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C y von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell.* 11(2): 345–349 (2012).
- Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N, Paradis G, Bronich TK, Alakhov VY y Kabanov AV. Evaluation of polyetherpolyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Therapy* 7(2): 126–138 (2000).
- Nicholas A, de Magalhaes JP, Kraysberg Y, Richfield EK, Levanon EY y Khrapko K. Age-related gene-specific changes of A-to-I mRNA editing in the human brain. *Mech Ageing Dev.* 131(6): 445–447 (2010).
- Odom GL, Gregorevic P y Chamberlain JS. Viral-mediated gene therapy for the muscular dystrophies: successes, limitations and recent advances. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772(2): 243–262 (2007).
- Ogawa T, Spina RJ, Martin WH, Kohrt WM, Schechtman KB, Holloszy JO y Ehsani AA. Effects of aging, sex, and physical training on cardiovascular responses to exercise. *Circulation* 86(2): 494-503 (1992).
- Ogris M, Steinlein P, Carotta S, Brunner S y Wagner, E. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS Pharm Sci.* 3(3): E 21 (2001).
- Ohkawa H, Ohishi N y Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2): 351-358 (1979).
- Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol.* 31(4): 443–448 (1996).
- O'Rourke EJ, Kuballa P, Xavier R y Ruvkun G. Omega-6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy. *Genes Dev.* 27(4): 429–440 (2013).
- Painter RG, Lanson NA, Jin Z, Park F y Wang G. Conditional expression of a suicide gene by the telomere reverse transcriptase promoter for potential post-therapeutic deletion of tumorigenesis. *Cancer Sci.* 96(9): 607-613 (2005).

- Parizkova J, Eiselt E, Sprynarova S y Wachtlova M. Body composition, aerobic capacity, and density of muscle capillaries in young and old men. *J Appl Physiol.* 31(3): 323–325 (1971).
- Park CB y Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol.* 193(5): 809–818 (2011).
- Park DC y Yeo SG. Aging. *Korean J Audiol.* 17(2): 39-44 (2013).
- Partridge, L. The new biology of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1537): 147–154 (2010).
- Partridge L y Gems D. Benchmarks for ageing studies. *Nature* 450 (7167): 165-7 (2007).
- Partridge M y Mangel L. Messages from mortality: the evolution of death rates in the old. *Trends Ecol Evol.* 14(11): 438-442 (1999).
- Pathak A, Patnaik S y Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnol J.* 4(11): 1559-1572 (2009).
- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8(2): 157–168 (2008).
- Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, Tulimaki K, Ketola A, Tenhunen A, Salonen T y Wahlfors J. Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol.* 25(6): 1753-1762 (2004).
- Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J y Richardson A. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell.* 8(1): 73–75 (2009).
- Perin EC, Silva GV, Vela DC, Zheng Y, Baimbridge F, Gahremanpour A, Quan X, Hahn W, Kim J, Wood K y Kitamura M. Human hepatocyte growth factor (VM202) gene therapy via transendocardial injection in a pig model of chronic myocardial ischemia. *Journal of Cardiac Failure* 17(7): 601–611 (2011).
- Pfaffl MW, Horgan GW y Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(9): e36 (2002).
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW y Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem.* 78: 959–991 (2009).
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V y Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med.* 5(1): 71-77 (1999).

- Qiu X, Brown K, Hirsche MD, Verdin E y Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 12(6): 662–667 (2010).
- Raffaello A y Rizzuto R. Mitochondrial longevity pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1813(1): 260–268 (2011).
- Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, Shroff R, Skepper J y Shanahan CM. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 121(20): 2200–2210 (2010).
- Raha S y Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet.* 106(1): 62-70 (2001).
- Rando TA y Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 148(1-2): 46–57 (2012).
- Rapti K, Louis-Jeune V, Kohlbrenner E, Ishikawa K, Ladage D, Zolotukhin S, Hajjar RJ y Weber T. Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Mol Ther.* 20(1): 73-83 (2012).
- Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Durr P y Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* 5(5): 379–389 (2006).
- Ristow M y Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51(2): 327–336 (2011).
- Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T y Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99(1): 111–120 (1999).
- Rizki G, Iwata TN, Li J, Riedel CG, Picard CL, Jan M, Murphy CT y Lee SS. The evolutionarily conserved longevity determinants HCF-1 and SIR-2.1/SIRT1 collaborate to regulate DAF-16/FOXO. *PLoS Genetics* 7(9): e1002235 (2011).
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM y Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434(7029): 113–118 (2005).
- Rodier F y Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 192(4): 547–556 (2011).
- Rodwell GE, Sonu R, Zahn JM, Lund J, Wilhelmy J, Wang L, Xiao W, Mindrinos M, Crane E, Segal E, et al. A transcriptional profile of aging in the human kidney. *PLoS Biology* 2(12): e427 (2004).
- Rolland AP. From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 15(2): 143-98 (1998).

- Rossi DJ, Jamieson CH y Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132(4): 681–696 (2008).
- Roy-Chowdhury J y Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther.* 5(4): 340-344 (2002).
- Rubinsztein DC, Marino G y Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 146(5): 682–695 (2011).
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C y DePinho RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96(5): 701–712 (1999).
- Russell SJ. Science, medicine, and the future. Gene therapy. *BMJ* 315(7118): 1289-1292 (1997).
- Russell SJ y Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(9): 681–691 (2007).
- Saenz DT y Poeschla EM. FIV: From lentivirus to lentivector. *J Gene Med.* 6(Suppl 1): S95-104 (2004).
- Sahin E y Depinho RA. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(6): 397–404 (2012).
- Salegio EA, Samaranch L, Kells AP, Mittermeyer G, San Sebastian W, Zhou S, Beyer J, Forsayeth J y Bankiewicz KS. Axonal transport of adeno-associated viral vectors is serotype-dependent. *Gene Ther.* 20(3): 348-352 (2013).
- Salminen A, Kaarniranta K y Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 4(3): 166–175 (2012).
- Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells AP, Bringas JR, Forsayeth J y Bankiewicz KS. Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 24(5): 526-532 (2013).
- Sands MS y Davidson BL. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Molecular Therapy* 13(5): 839–849 (2006).
- Satoh A, Stein L y Imai S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handbook of Experimental Pharmacology* 206: 125–162 (2011).
- Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int.* 10(Suppl 1): S213-220 (2010).
- Scaffidi P y Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312(5776): 1059–1063 (2006).

- Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD y Groothuis DR. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res.* 58(3): 312-28 (1999).
- Schliebs R y Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res.* 221(2): 555-63 (2011).
- Schmucker DL. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp Gerontol.* 40(8-9): 650-659 (2005).
- Schmucker DL y Sachs H. Quantifying dense bodies and lipofuscin during aging: a morphologist's perspective. *Arch Gerontol Geriatr.* 34(3): 249-261 (2002).
- Segura MM, Alba R, Bosch A y Chillón M. Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther.* 8(4): 222-235 (2008).
- Sena LA y Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 48(2): 158-167 (2012).
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5): 593-602 (1997).
- Seternes T, Sørensen K y Smedsrød B. Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11): 7594-7597 (2002).
- Shen S, Bryant KD, Brown SM, Randell SH y Asokan A. Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem.* 286(15): 13532-13540 (2011).
- Shen Y, Wollam J, Magner D, Karalay O y Antebi A. A steroid receptor-microRNA switch regulates life span in response to signals from the gonad. *Science* 338(6213): 1472-1476 (2012).
- Shephard R. Maximal oxygen intake and independence in old age. *Br J Sports Med.* 43(5): 342-346 (2009).
- Sindler AL, Delp MD, Reyes R, Wu G y Muller-Delp JM. Effects of aging and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol.* 587(Pt 15): 3885-3897 (2009).
- Sinn PL, Sauter SL y McCray PB. Gene therapy progress and prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors design, biosafety, and production. *Gene Ther.* 12(14): 1089-1098 (2005).
- Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, Stazi MA, et al. Longevity studies in GenomEUtwin. *Twin Research* 6(5): 448-454 (2003).

- Slagboom PE, Beekman M, Passtoors WM, Deelen J, Vaarhorst AA, et al. Genomics of human longevity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366(1561): 35–42 (2011).
- Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S y Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J.* 266(2): 313-327 (1990).
- Smith-Vikos T y Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci.* 125(Pt 1): 7–17 (2012).
- Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, Huang JW, Leung CH, Samulski RJ, Boulis NM y Federici T. Comparison of adeno-associated viral vectors serotypes for spinal cord and motor neuron delivery. *Hum Gene Ther.* 22(9): 1129-1135 (2011).
- Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S y Konishi F. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol.* 44(11): 727–732 (2009).
- Sokolic R, Kesserwan C y Candotti F. Recent advances in gene therapy for severe congenital immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Hematology* 15(4): 375–380 (2008).
- Sola-Gallego JJ y Panizo A. Caracterización inmunohistoquímica de los tumores hepáticos. Una aproximación práctica al diagnóstico del hepatocarcinoma. *Gh Continuada* 9(1): 30-36 (2010).
- Solon-Biet SM, , McMahon AC, Ballard JW, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, Warren A et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* 19(3): 418–430 (2014).
- Sondhi D, Hackett NR, Peterson DA, Stratton J, Baad M, Travis KM, Wilson JM y 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.* 15(3): 481–491 (2007).
- Spence A. P. Biology of Human Aging. *Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.* (1995).
- Stoessl AJ. Assessing the integrity of the dopamine system in Parkinson's disease: how best to do it? *MovDisord.* 16(5): 804-6 (2006).
- Strehler B. L. Time, Cells, and Aging. *Demetriades Brothers, Larnaca* (1999).
- Summerford C y Samulski RJ. Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72(2): 1438-1445 (1998).
- Sun D, Huang A, Yan EH, et al. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(6): 2249–2256 (2004).

- Swift M, Kleinman H y DiPietro L. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest.* 79(12): 1479-1487 (1999).
- Swindell WR. Gene expression profiling of long-lived dwarf mice: longevity associated genes and relationships with diet, gender and aging. *BMC Genomics* 8: 353 (2007).
- Swindell WR, Masternak MM, Kopchick JJ, Conover CA, Bartke A y Miller RA. Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice. *Mech Ageing Dev.* 130(6): 393–400 (2009).
- Taaffe DR. Sarcopenia: Exercise as a treatment strategy. *Aust Fam Physician.* 35(3): 130-134 (2006).
- Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 10(1): 36–46 (2010).
- Talavera A. Terapia Génica viral. La paradoja de los lentivirus. *Terapia Génica: ¿Memoria o Esperanza?* Ed. Complutense. 23-33 (2008).
- Talavera A, Liras A, Fuentes L, Sánchez H. El VIH y otros retrovirus complejos en la Terapia Génica de células en reposo. *Virología* 7: 2-15 (2000).
- Talavera A, Martín F y Sánchez H. Los virus en la terapia génica. *Virología* 4: 3-15 (1996).
- Talavera A y Sánchez H. Nuevos sistemas virales en Terapia Génica. *Virología* 10:1-16 (2004).
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI y Heijmans BT. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Ageing Cell.* 11(4): 694–703 (2012).
- Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T, et al. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand.* 178(1): 3–10 (2003).
- Tang GP, Zeng JM, Gao SJ, Ma YX, Shi L, Li Y, Too HP y Wang S. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. *Biomaterials* 24(13): 2351–2362 (2003).
- Tang MX y Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 4(8): 823-32 (1997).
- Tang QS, Zhang DS, Cong XM, Wan ML y Jin LQ. Using thermal energy produced by irradiation of Mn–Zn ferrite magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression. *Biomaterials* 29(17): 2673–2679 (2008).

- Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, Kim HS, Flynn CR, Hill S, Hayes McDonald W, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*. 40(6): 893–904 (2010).
- Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z y Baekelandt V. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther*. 18(3): 195–206 (2007).
- Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS y Calos MP. Sitespecific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Molecular and Cellular Biology* 21(12): 3926–3934 (2001).
- Toledano H, D'Alterio C, Czech B, Levine E y Jones DL. The let-7-Imp axis regulates ageing of the Drosophila testis stem-cell niche. *Nature* 485(7400): 605–610 (2012).
- Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, et al. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol*. 180(3): 963–972 (2012).
- Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135(4): 609–622 (2008).
- Towne C, Raoul C, Schneider BL y Aebischer P. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther*. 16(6): 1018-1025 (2008).
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A y Wibom R. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429(6990): 417–423 (2004).
- Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. 98(4): 899–905 (1996).
- Ungvari Z, Buffenstein R, Austad SN, Podlutzky A, Kaley G y Csiszar A. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species. *Front Biosci*. 13: 5056–5070 (2008).
- Ungvari Z, Orosz Z, Labinsky N, et al. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-κB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(1): 37–47 (2007).
- Ugalde AP, Espanol Y y Lopez-Otin C. Micromanaging aging with miRNAs: new messages from the nuclear envelope. *Nucleus* 2(6): 549–555 (2011).

- Valledeoriola F., Puig-Junoy J. y Puig-Peiró R. Workgroup of the SCOPE study. Cost analysis of the treatments for patients with advanced Parkinson's disease: SCOPE study. *J Med Econ.* 16(2): 191-201 (2013).
- VanGuilder HD, Farley JA, Yan H, Van Kirk CA, Mitschelen M, Sonntag WE y Freeman WM. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol Dis.* 43(1): 201-12 (2011).
- Van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, Teuling E, Garcia-Arencibia M, Kim HE, Du D, Thijssen KL, Wiersma M, Burggraaff R, et al. Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell* 142(4): 601–612 (2010).
- Van hooren V, Dewaele S, Kuro-O M, Taniguchi N, Dollé L, van Grunsven LA, Makrantonaki E, Zouboulis CC, Chen CC y Libert C. Alteration in N-glycomics during mouse aging: a role for FUT8. *Aging Cell.* 10(6): 1056-1066 (2011).
- Van Maele B, De Rijck J, De Clercq E y Debyser Z. Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol.* 77(8): 4685-4694 (2003).
- Van Raamsdonk JM y Hekimi S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5(2): e1000361 (2009).
- Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics.* 16(1): 29–37 (2003).
- Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA y Loeb LA. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet.* 40(4): 392–394 (2008).
- Vilchez D, Morante I, Liu Z, Douglas PM, Merkwirth C, Rodrigues AP, Manning G y Dillin A. RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* 489(7415): 263–268 (2012).
- Walker GA y Lithgow GJ. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell.* 2(2): 131–139 (2003).
- Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C y von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell.* 8(3): 311–323 (2009).
- Wang H y Lieber A. A helper-dependent capsid modified adenovirus vector expressing adenoassociated virus rep78 mediates site-specific integration of a 27-kilobase transgene cassette. *J Virol.* 80(23): 11699-11709 (2006).

- Wang K y Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7(3): 297–300 (2011).
- Wang M, Zhang J, Jiang LQ, et al. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension* 50(1): 219–227 (2007).
- Weitzman MD, Young SM, Cathomen T y Samulski RJ. Targeted integration by adeno-associated virus. *Methods Mol Med.* 76: 201-219 (2003).
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L y Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323(5917): 1063–1066 (2009).
- Weyler M y Morschhauser J. Tetracycline-inducible gene expression in *Candida albicans*. *Methods in Molecular Biology* 845: 201–210 (2012).
- Wiethoff CM y Smith JG. The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 276(35): 32806-32813 (2001).
- Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, Hejtmančík JF, Nadon N, Strong R, Wood LK, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell.* 11(4): 675–682 (2012).
- Wolff S, Ma H, Burch D, Maciel GA, Hunter T y Dillin A. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* 124(5): 1039–1053 (2006).
- Wong TK y Nicolau C. Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene* 10(2): 87-94 (1980).
- Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther.* 19(5): 463- 474 (2008).
- Wu JC, Sundaresan G, Iyer M y Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther.* 4(4): 297–306 (2001).
- Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW y James OF. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 9(2): 297-301 (1989).
- Yamada K, Ramezani A, Hawley RG, Ebell W, Arwert F, Arnold LW y Walsh CE. Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector. *Mol Ther.* 8(4): 600-610 (2003).
- Yan Z, Okutsu M, Akhtar Y y Lira V. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 110(1): 264–274 (2011).

- Yang XQ y Chen AF. High-cholesterol diet augments endothelial dysfunction via elevated oxidative stress and reduced tetrahydrobiopterin in Ins2 (Akita) mice, an autosomal dominant mutant type 1 diabetic model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36(8): 764-769 (2009).
- Yannaki E, Emery DW y Stamatoyannopoulos G. Gene therapy for beta thalassaemia: the continuing challenge. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12: e31 (2010).
- Yarasheski KE. Exercise, aging, and muscle protein metabolism. *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci.* 58(10): 918-922 (2003).
- Yotnda P, Chen DH, Chiu W, Pietra P, Davis A, Smyth Templeton N y Brenner M K. Bilamellar Cationic Liposomes Protect Adenovectors from Preexisting Humoral Immune Responses. *Mol Ther.* 5(3): 233-241 (2002).
- Zahn JM, Sonu R, Vogel H, Crane E, Mazan-Mamczarz K, Rabkin R, Davis RW, Becker, et al. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS Genetics* 2(7): e115 (2006).
- Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, et al. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Therapy* 16(12): 892–899 (2009).
- Zeng X, Pan S, Li J, Wang C, Wen Y, Wu H, Wu C y Feng M. A novel dendrimer based on poly (l-glutamic acid) derivatives as an efficient and biocompatible gene delivery vector. *Nanotechnology* 22(37): 375102 (2011).
- Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, Thorpe SR, Baynes JW, Epstein C, Richardson A, et al. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 64(12): 1212–1220 (2009).
- Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G y Cai D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* 497(7448): 211–216 (2013).
- Zhang X, Shi GF, Liu XZ, An LJ y Guan S. Anti-ageing effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice. *Cell Biochem Funct.* 29(4): 342-347 (2011).
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G y Rabinowitz J. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 16(6): 1073-1080 (2008).

Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ y Muzyczka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6(6): 973-85 (1999).

Paginas web

Página de información sobre envejecimiento.

<http://www.senescence.info>

Asociación de Familiares de Enfermos de Alzheimer, AFEDAZ.

<http://www.afedaz.com/>

Instituto Canario de Estadística, ISTAC.

http://www.gobiernodecanarias.org/istac/temas_estadisticos/demografia/