

## Terapia génica no invasiva en enfermedades neurológicas

José M. Brito-Armas, Javier Castro-Hernández, Manuel Rodríguez-Díaz, Rafael Castro-Fuentes

**Introducción.** La terapia génica cerebral consiste en la introducción de ácidos nucleicos en el tejido nervioso cuya expresión pueda resultar de utilidad terapéutica. Mediante la terapia génica no invasiva, este material genético es introducido indirectamente por vía sanguínea, evitando su inyección directa en el parénquima cerebral y el daño de la barrera hematoencefálica.

**Objetivo.** Discutir los diferentes vectores y vías no invasivas de transferencia génica al sistema nervioso central.

**Desarrollo.** En los últimos años se ha producido un giro espectacular en las estrategias para la transferencia génica no invasiva del sistema nervioso central. El desarrollo de nuevos serotipos de vectores adenoasociados, como AAV9, de una gama de nanopartículas funcionalizadas, como inmunoliposomas pegilados, nanopartículas poliméricas, nanopartículas pegiladas, dendrímeros, fulerenos, así como de transportadores específicos de la familia de receptores de lipoproteína de baja densidad, permite introducir y expresar material genético en el tejido nervioso tras la administración periférica de dichos vectores.

**Conclusiones.** La terapia génica no invasiva supone nuevas y excitantes perspectivas para el tratamiento de las numerosas enfermedades neurológicas para las cuales no existen tratamientos farmacológicos efectivos. Los estudios ya realizados en animales resultan altamente prometedores y es probable que, en los próximos años, den lugar a procedimientos de terapia génica útiles y seguros para su uso en pacientes.

**Palabras clave.** AAV9. Barrera hematoencefálica. Cerebro. Enfermedades neurodegenerativas. Nanopartículas. Terapia génica. Vectores virales.

### Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades neurológicas suponen más del 30% del total de las enfermedades que afectan al ser humano. Si sólo se contabilizan las enfermedades no susceptibles de tratamiento efectivo, este porcentaje se incrementa ostensiblemente. Patologías frecuentes y graves como el autismo, la enfermedad de Alzheimer, los tumores cerebrales, los ictus, etc., no disponen de tratamientos curativos eficientes en la actualidad. Uno de los factores que dificulta el desarrollo de nuevas terapias es la barrera hematoencefálica (BHE), la cual limita en muchos casos el acceso del agente terapéutico al tejido neural. La BHE está constituida por una estructura vascular especializada formada por la interacción entre células endoteliales y numerosos procesos de astrocitos que regulan el paso y difusión de moléculas entre el plasma y el sistema nervioso central (SNC) [1]. Este endotelio se distingue del presente en otros tejidos por la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales (las cuales limitan importantemente el intercambio incluso de sustancias de bajo peso molecular) y por una actividad endocítica y pinocítica reducida. Las moléculas pequeñas (generalmente in-

feriores a 500 Da) y algunos péptidos liposolubles pequeños pueden pasar la BHE sin la mediación de transportadores específicos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, el trasiego por la BHE precisa de transcitosis mediada por receptores o transportadores selectivos, como el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), el receptor de insulina, el receptor de leptina, el receptor de transferrina y el receptor de factor de crecimiento similar a la insulina [1]. El número de transportadores específicos que median el trasiego de sustancias a través de la BHE es muy elevado y probablemente representa una parte muy sustancial de los más de 2.000 transportadores de membrana que previsiblemente funcionan en la célula humana. En esta revisión presentaremos algunos de los 'ingenios' recientemente desarrollados para salvar esta barrera y facilitar el acceso de genes terapéuticos al sistema nervioso. De entre las enfermedades neurológicas para las que no disponemos de tratamiento etiopatogénico y que podrían ser susceptibles de terapia génica, consideraremos aquí con especial atención a la enfermedad de Parkinson (EP). Se trata de una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal. Las distintas modalidades de tratamiento sintomático dispo-

Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED (M. Rodríguez-Díaz). Departamento de Fisiología (J.M. Brito-Armas, M. Rodríguez-Díaz, R. Castro-Fuentes); Departamento de Anatomía (J. Castro-Hernández); Facultad de Medicina; Universidad de La Laguna. La Laguna, Tenerife, España.

#### Correspondencia:

Dr. Rafael Castro Fuentes. Laboratorio de Neurobiología y Terapia Génica. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Campus de Ofra, s/n. E-38320 La Laguna (Tenerife).

#### Fax:

+34 922 319 397.

#### E-mail:

jrcastro@ull.es

#### Financiación:

CIBERNED. Proyecto I+D+i de la Dirección General de Investigación, del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2008-03746).

Acceptado tras revisión externa: 04.01.11.

#### Cómo citar este artículo:

Bruto-Armas JM, Castro-Hernández J, Rodríguez-Díaz M, Castro-Fuentes R. Terapia génica no invasiva en enfermedades neurológicas. Rev Neurol 2011; 52: 603-17.

© 2011 Revista de Neurología

nibles (agonistas dopaminérgicos, palidotomía, estimulación cerebral profunda...) permiten aminorar la expresión sintomática de la enfermedad. Sin embargo, la progresión de la degeneración hace que la efectividad de estos tratamientos decrezca ostensiblemente con la evolución de la EP. La reducción de la eficacia terapéutica se acompaña de un incremento progresivo de efectos colaterales indeseables, los cuales, junto con la degeneración frecuente de otros grupos celulares, ensombrecen notablemente el pronóstico de estos pacientes. En la última década se han descrito distintas proteínas –factor neurotrófico derivado de una línea celular glial humana (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)...– capaces de reducir la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en animales de laboratorio. Por distintas razones, la administración central de estas proteínas no ha resultado efectiva en pacientes (vida media corta, poca difusión por el tejido neural...). Dado que se conoce el sustrato celular y neuroquímico de la enfermedad, y se conocen diversas proteínas con capacidad neuroprotectora para estas células, la terapia génica se perfila aquí como una alternativa terapéutica con futuro.

### Terapia génica: tratamiento alternativo para el sistema nervioso central

Los fármacos convencionales de pequeño peso molecular han sido diseñados para que se difundan en las células mediante cinéticas precisas y, donde sea necesario, empleando sistemas de transporte específicos. La terapia de proteínas es más compleja, especialmente si tiene que actuar intracelularmente, porque no hay muchas vías celulares para importar proteínas. Además, estas moléculas no pueden administrarse oralmente. La situación se hace compleja cuando se quiere administrar ácidos nucleicos, debido a su tamaño (MDa) y a la falta de sistemas de importación a través de la membrana celular, especialmente en el núcleo celular. Por tanto, los ácidos nucleicos necesitan ser empaquetados de forma natural en partículas virales que satisfagan muchas de estas propiedades o en partículas artificiales que puedan sustituir a los virus. La vida media del tratamiento es también completamente diferente, ya que la transformación que se consigue con los ácidos nucleicos puede significar una alteración permanente, al contrario que el tratamiento con fármacos convencionales, el cual es intrínsecamente transitorio.

La terapia génica se define como la introducción de ácidos nucleicos en células para modificar el curso de una condición médica o enfermedad. Inicial-

mente propuesta para el tratamiento de enfermedades monogénicas, la terapia génica es reconocida ahora como ‘una nueva forma de administración de fármacos’ que ofrece estrategias diversas para el tratamiento de enfermedades innatas y adquiridas. Si el futuro de la terapia génica está en competir con éxito con el tratamiento farmacológico clásico, será necesario disponer de métodos económicos, simples y eficaces de transferencia génica.

La expresión en el cerebro de genes administrados exógenamente se ha propuesto como terapia alternativa para una gran variedad de enfermedades hereditarias y adquiridas del SNC para las que la farmacoterapia clásica no es asequible o no resulta fácilmente aplicable. La transferencia génica en el SNC se ha investigado como estrategia de protección contra lesiones neuronales y degeneración. Los mejores candidatos para terapia génica son los factores neurotróficos, moléculas antioxidantes o antiapoptóticas, y diferentes moléculas específicas de señalización celular, las cuales son de gran interés para neuroprotección en condiciones patológicas en las que hay formación de radicales libres (esclerosis lateral amiotrófica, EP, enfermedades de Alzheimer y Huntington, isquemia cerebral y otras) [2,3].

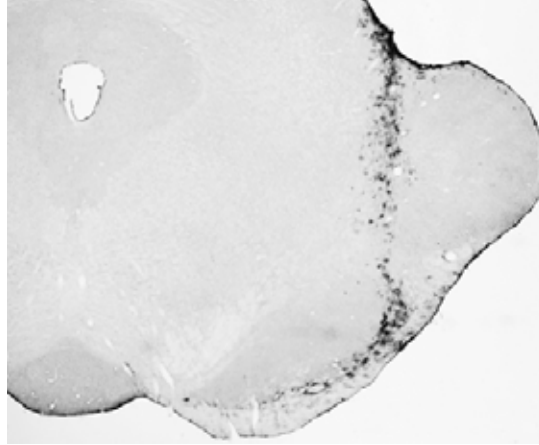
Para lograr una transferencia génica exitosa es crucial la elección del vehículo (vector) que va a transferir el gen terapéutico (transgén) al tejido o tipo celular deseado. Básicamente, los vectores utilizados en terapia génica pueden dividirse en dos grandes grupos, virales y no virales, cada uno de los cuales presenta ventajas e inconvenientes. Algunos de los vectores virales que han mostrado su eficacia para transferir genes *in vivo* en el SNC (especialmente lentivirus y virus adenoasociados) pueden integrarse en los cromosomas de las células transducidas, favoreciendo una expresión duradera del transgén en los animales de experimentación [4]. En varios casos, se transforman genéticamente algunas líneas celulares para producir neurotransmisores o factores neurotróficos en grandes cantidades, la conocida terapia génica *ex vivo*, con la finalidad de utilizarse como alternativas terapéuticas en trastornos del SNC [5]. Sin embargo, los vectores virales generan importantes problemas relacionados con su producción y seguridad [6]. Además, algunos vectores virales inducen una respuesta inmune que disminuye la eficacia y bioseguridad con una administración repetida. Una complicación adicional del uso de algunos vectores virales es su tendencia a integrarse cerca de promotores y en unidades transcripcionales, aumentando con ello la posibilidad de causar efectos adversos [7].

En los últimos años, ha habido importantes esfuerzos por desarrollar estrategias alternativas no

virales de transferencia génica *in vivo*. En este sentido, se ha empleado ADN desnudo, ligado a una variedad de conjugados moleculares, como liposomas, nanopartículas no lipídicas, polímeros y polipéptidos. Con estos vectores, la manufactura de ADN a gran escala resulta factible, reproducible, y el producto final no requiere condiciones sofisticadas de almacenamiento. Además, los vectores no virales no presentan restricciones en relación con el tamaño del gen ni provocan una respuesta inmunológica significativa [8]. Sin embargo, con el uso de un vector no viral, la entrada del material genético a la célula es limitada, debido a la necesidad de proporcionar el ADN en la superficie celular en concentraciones suficientes para su entrada [9]. Los vectores no virales presentan también dificultad para inducir una expresión duradera del gen terapéutico [8,10]. Aunque este hecho limita de momento su uso en terapia génica de enfermedades cerebrales, no es menos cierto que en los últimos años ha habido un desarrollo espectacular en cuanto a su diversidad, propiedades y manufacturación.

La elección de un vector apropiado que transfiera el gen deseado en el área cerebral afectada es crucial a la hora de establecer una terapia génica segura y eficiente para el SNC. Durante los últimos años, ha habido mucha investigación en terapia génica, con progresos significativos en el desarrollo de nuevas estrategias de transferencia génica en el SNC y en la evaluación de su potencial en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Entre los diferentes sistemas desarrollados para este propósito, los vectores virales han sido, sin duda, los más usados. Sin embargo, debido al impedimento de las medicinas génicas en cruzar la BHE, la mayoría de los trabajos realizados han utilizado vectores virales adenoasociados o vectores lentivirales (empleando rutas invasivas de administración, como la inyección intracerebral con craneotomía) y que, además, producen una expresión génica localizada (Fig. 1). Aunque la inyección directa intracerebral de vectores virales que expresan transgenes –terapia génica invasiva (TGi)– puede ser una alternativa razonable para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas localizadas, en las que están implicadas estructuras anatómicas discretas del cerebro [11], el tratamiento de muchos trastornos neurológicos requiere la transferencia del transgén a todo el SNC. Por otro lado, el pequeño tamaño del ratón (principal modelo animal empleado) favorece una expresión génica más distribuida, siendo necesarias apenas cinco inyecciones de vector en todo el cerebro. Sin embargo, el mayor tamaño del cerebro humano requeriría demasiadas inyecciones locales, haciendo el procedimiento clí-

**Figura 1.** Procedimiento invasivo de inyección estereotáctica de partículas virales. Expresión de proteína verde fluorescente dos meses después de la inyección de un vector lentiviral en la sustancia negra de la rata: evidencia inmunohistoquímica. Obsérvese también el trayecto de la aguja.



nicamente impracticable. Por ello, en los últimos años se ha producido un giro espectacular en las estrategias de transferencia no invasiva de genes terapéuticos en el SNC –terapia génica no invasiva (TGni)–. En este tipo de transferencia génica, se introducen ácidos nucleicos indirectamente (generalmente por vía sanguínea) en el tejido nervioso, con objeto de lograr una utilidad terapéutica, evitándose así su inyección directa en el parénquima cerebral y el daño en la BHE. A continuación se hará una descripción de los tipos y características más importantes de los vectores virales y no virales que posibilitan la realización de una TGni en el SNC.

### Vectores virales adenoasociados

Originalmente identificados como un ‘virus satélite defectivo’ encontrado como un contaminante en almacenes de laboratorio de adenovirus, pronto se descubrió que los parvovirus adenoasociados salvajes son defectivos para replicación en ausencia de virus colaboradores (adenovirus o virus herpes) [12]. Los virus adenoasociados (AAV) son pequeños virus sin envuelta, de 20-24 nm de diámetro, que no han sido asociados con ninguna enfermedad en humanos [13]. El genoma de 4,7 kb del virus es empaquetado como una molécula de ADN de cadena sencilla, que se convierte en doble cadena después de la infección. Los vectores AAV recombinantes

(AAVr) carecen del 96% del genoma viral, el cual ha sido removido para dejar sólo las dos repeticiones terminales invertidas que participan en el empaquetamiento e integración [14]. El método convencional para generar *stocks* virales consiste en realizar una cotransfección transitoria de las células 293T con plásmidos que contienen el genoma vector, los genes *rep* y *cap*, y el adenovirus ayudante [15]. Ha habido mejoras recientes en la producción de vectores AAVr, dando como resultado títulos mayores (entre unas 100 y 10.000 veces), una mayor proporción de partículas infecciosas y, también, preparaciones libres de adenovirus [16]. Los vectores AAV expresan establemente los productos transgénicos en células en división y en las que no se dividen; y aunque la ausencia de genes virales minimiza en teoría el riesgo de activar respuestas inmunes en el hospedador, esto dependerá en gran medida del serotipo empleado y del tejido diana [17,18]. Entre las limitaciones de los vectores AAV cabe destacar una pequeña capacidad de clonación (3-4 kb) y una expresión demorada del transgén (2-3 semanas) [19].

Desde la manipulación y primera aplicación exitosa en 1984 del serotipo 2 de AAVr (AAV2) como un vehículo de transferencia génica, se han aislado y caracterizado numerosos serotipos de AAVr. Aunque muchos de estos virus presentan buenas eficiencias de transducción en varios órganos corporales, por vía simple de administración sistémica, la transducción generalizada del SNC con métodos relativamente no invasivos ha resultado ineficaz. Hemos comentado previamente que la BHE madura actúa como una barrera protectora que excluye moléculas y microorganismos potencialmente dañinos, según su tamaño, carga y liposolubilidad. Consecuentemente, la BHE bloquea eficientemente la difusión de AAVr en el SNC [20]. Los investigadores han tenido entonces que recurrir a inyecciones de vectores virales directamente en el cerebro. Estas inyecciones producen una transducción robusta, pero relativamente local, y requieren neurocirugía invasiva (Fig. 1). Algunos serotipos de AAV caracterizados previamente, como AAV1, AAV2 y AAV5, presentan unos niveles y especificidad de transducción variados (dependiendo del sitio de inyección) al administrarse directamente en el cerebro [21,22]. Por ejemplo, una gran proporción de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra son infectadas con un vector AAV2, siendo la eficiencia de transducción y difusión mucho más baja en el estriado [23].

Hasta ahora se han identificado nueve serotipos de vectores AAV, y los trabajos con genes indicadores han mostrado que estos vectores infectan eficientemente las neuronas [24]. Los receptores res-

ponsables de la infección de vectores AAV en neuronas no están completamente caracterizados, pero varios estudios sugieren que la unión del vector AAV a la superficie celular depende de proteoglicanos de sulfato de heparina [25]. La coinfección de heparina y manitol incrementa la difusión de los vectores AAV2. Además, la actuación de correceptores es necesaria para una entrada viral satisfactoria [26]. La infusión intravenosa previa de manitol en ratón no sólo induce una transducción global en el SNC, facilitando la entrada de AAV2 inyectado también por vía intravenosa, sino que produce beneficios terapéuticos en modelos de enfermedades neurológicas en las que hay una afectación generalizada [27]. Las células permisivas a vectores AAV2 expresan un número de factores, entre los que se incluyen el receptor del factor de crecimiento fibroblástico y la subunidad  $\beta 5$  de la integrina  $\alpha \beta 5$  [26,28]. Por otro lado, la adhesión de los vectores AA5 a las células depende de su unión a ácido siálico [29], siendo también necesario el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- $\alpha$ ) [30]. Comparado con el vector AAV2, el serotipo AA5 produce una mayor transducción y difusión en el cerebro [22]. Por tanto, la transducción de AAV en cualquier órgano está muy ligada a la densidad local de un receptor específico.

Una limitación importante de los estudios previos era que la falta de uniformidad, tanto en el diseño de plásmidos, como en la producción, purificación y ruta de administración, hacían difícil la comparación de las eficiencias de transducción de estos serotipos en los diferentes tejidos. Con objeto de controlar la variabilidad en estos parámetros, se ha estandarizado el diseño de plásmidos, la transfección, purificación, titulación, diálisis, almacenamiento e inyección, para todos los serotipos de AAV examinados. Estas limitaciones se resuelven mediante el empleo de genes marcadores en los que su expresión pueda ser visualizada en 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 [31]. Consecuentemente, las diferencias halladas en las eficiencias de transducción y en los perfiles de biodistribución serán reflejo exclusivamente de las diferencias en las cápsides de los viriones de estos serotipos.

Desde su aislamiento, ha habido un progresivo entendimiento de las propiedades biológicas de los virus adenoasociados, mejorando nuestra habilidad para manipularlos y usarlos como un vector de te-

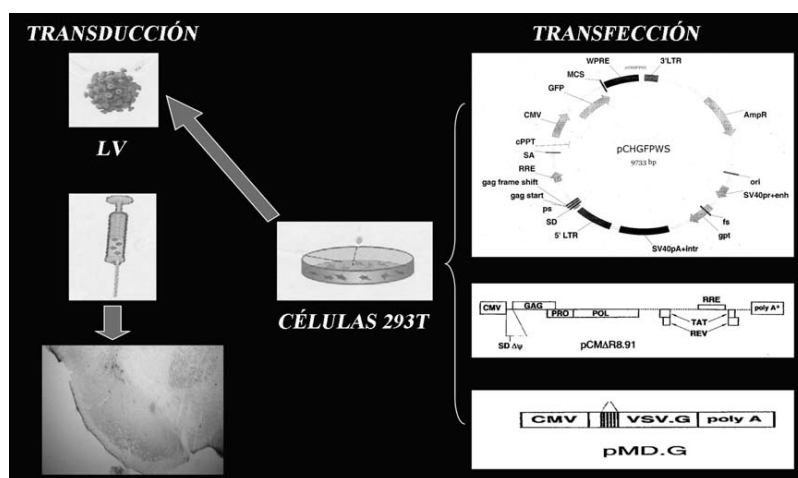
rapia génica de amplio espectro, seguro y eficiente. El dominio web <http://www.clinicaltrials.gov> [fecha de última consulta: 10.09.2010] recoge cerca de 93.800 ensayos clínicos con localizaciones en 173 países: Actualmente hay 16 ensayos en diferentes fases que evalúan el uso de vectores AAV para enfermedades neurológicas. Aunque para las enfermedades neurodegenerativas citadas se emplea o propone, según la fase de ensayo, una estrategia invasiva de terapia génica, hay nuevos serotipos de AAV (como el AAV9) que posibilitan la transferencia no invasiva de transgenes en el SNC.

## Vectores lentivirales

Los lentivirus son miembros de la familia de retrovirus con una habilidad única para traslocarse a través de la membrana nuclear e infectar células posmitóticas [32]. Para aprovechar esta importante ventaja, se han desarrollado vectores lentivirales derivados del virus 1 de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) [32] o virus no humanos (virus de la inmunodeficiencia simia y felina, y virus de la anemia infecciosa equina) [33].

Debido a la toxicidad de algunos componentes virales, las partículas lentivirales se producen generalmente mediante transfección transitoria de células HEK-293T con un plásmido de empaquetamiento que expresa proteínas gag (de la nucleocápside viral) y pol (transcriptasa reversa e integrasa), un plásmido de envuelta –frecuentemente la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)– y, finalmente, un vector de transferencia que expresa el ARN encapsidado en las partículas virales (Fig. 2). Los componentes virales son codificados por diferentes plásmidos para disminuir el riesgo de recombinación con el genoma del vector, el cual retiene normalmente < 5% del genoma parental. Con los vectores lentivirales de tercera generación, se incorporan elementos estructurales importantes para la biología básica y propiedades de bioseguridad de los virus [34]. Después de 48 a 70 horas de realizada la transfección, se recoge el sobrenadante, y se concentran mediante ultracentrifugación las partículas virales (Fig. 2). El procedimiento estereotáctico estándar ha sido el más empleado para inyectar directamente los vectores en las regiones cerebrales seleccionadas (Figs. 1 y 2). En cerebros de roedores y primates se han inyectado vectores lentivirales que expresan genes indicadores –de la proteína verde fluorescente (GFP) o de la  $\beta$ -galactosidasa (lacZ)– para analizar su actividad [34] (Figs. 1 y 2). Los vectores autoinactivantes pseudotipados con la envuel-

**Figura 2.** Construcción y purificación de partículas de vectores lentivirales (LV) derivados de virus 1 de la inmunodeficiencia humana que expresan GFP y pseudotipados con la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se producen mediante una triple transfección transitoria de células 293T con un plásmido de empaquetamiento atenuado de segunda generación (pCMV $\Delta$ 8.91) al que le faltan los genes *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*. El ADNc de la GFP es clonado en un plásmido de transferencia (pCHMWS) que contiene un sitio de policlonaje, una delección autoinactivante en U3 (delección SIN-18), el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) y la secuencia cPPT/CTS. Los sobrenadantes eran recogidos desde el día 2 y filtrados hasta el día 5 tras la transfección. Las partículas de vector del sobrenadante eran sedimentadas por ultracentrifugación. Para la inyección estereotáctica en el cerebro, se redisolven las partículas de LV en PBS y se realiza una centrifugación adicional hasta concentrarlos unas 8.000 veces.



ta de VSV-G pueden infectar neuronas con alta eficiencia. Estos vectores lentivirales producen una expresión duradera y sostenida de los transgenes [35,36].

Hemos comentado que la administración intravenosa de vectores que expresan genes terapéuticos está controlada por la BHE, la cual limita su efectividad, siendo la estrategia de transferencia intracerebroventricular aguda o crónica la más utilizada. Esta alternativa terapéutica presenta inconvenientes técnicos significativos derivados de las propiedades químicas del vector empleado y de los procedimientos experimentales.

La vía endovenosa constituye un método mínimamente invasivo para el cerebro, basado en la inyección en el espacio del líquido cefalorraquídeo (LCR) y a través de la cisterna magna de vectores virales no replicativos. Los vectores inyectados infectan exclusivamente las células neuroectodérmicas que tapizan el espacio del LCR (incluyendo los espacios de Virchow-Robin) y que forman la barrera sangre-LCR que rodea el cerebro y la médula espinal (por ejemplo, células endoteliales, coroidales y leptomeníngeas). El genoma viral entra en el núcleo de las células infectadas, posibilitando la transcripción génica, de manera que la proteína co-

dificada por el transgén es traducida en el citoplasma de la célula, y es secretada en el LCR. Una vez secretadas, las proteínas difunden a través de la vía endimaria o de la duramadre (en el parénquima del SNC), siendo aún biológicamente activas desde el punto de vista terapéutico. Sólo pueden emplearse los vectores que cumplan los siguientes criterios:

- *Vectores capaces de infectar células que no se dividen*, debido a la tasa muy baja de proliferación de las células endimarias y leptomenígeas.
- *Vectores que puedan obtenerse con títulos muy altos*, porque sólo pueden inyectarse volúmenes muy pequeños (hasta 10-15  $\mu\text{L}$  en ratón).
- *Vectores que desencadenen muy poca o ninguna respuesta inmunitaria*, porque en muchas enfermedades del SNC (sobre todo en las neurodegenerativas) existe ya de base una reacción inmune.
- *Vectores que expresen el transgén a largo plazo*, porque la inyección intratecal repetida de los vectores no es una alternativa factible para la práctica clínica.

El plexo coroideo desempeña un papel crítico en el mecanismo de la barrera que regula el intercambio de moléculas entre el medio interno del cerebro y la periferia [37]. Esta barrera sangre-LCR está compuesta de células epiteliales con uniones estrechas apicales que restringen el paso intercelular de moléculas desde los vasos sanguíneos. La función del sistema circulatorio del LCR es suministrar de manera extensa, micronutrientes, neurotrofinas, hormonas, neuropéptidos y factores de crecimiento a las redes neuronales [37]. Por tanto, los neuromoduladores dirigidos al LCR pueden modificar una variedad de procesos conductuales, neuroendocrinos e inmunológicos [38]. Recientemente se ha descrito un enfoque genético cerebral mínimamente invasivo para la transferencia de péptidos o proteínas de secreción en el LCR [39]. Consiste en la utilización de un promotor específico de plexo coroideo que se introduce en un sistema genético constituido por un vector lentiviral, y que permite la transferencia inducible y reversible de un producto génico en el LCR. La funcionalidad de dicho sistema quedó demostrada al sobreexpresar dos neuropéptidos establecidos, el factor de liberación de corticotropina (CRF) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), los cuales modulan, respectivamente, la conducta similar a la ansiedad y el ciclo del estro.

El empleo de vectores lentivirales en la práctica clínica ha estado limitado, debido a los riesgos asociados de mutagénesis insercional. Con objeto de superar este problema, se ha desarrollado un vector lentiviral no integrativo derivado de HIV-1, a base

de generar una mutación en la integrasa clase 1 [40]. Estos vectores mutantes eran capaces de transducir eficientemente líneas celulares no quiescentes y cultivos primarios de neuronas y, además, eran también eficientes *in vivo*, permitiendo la expresión de GFP en las células cerebrales de ratón, tras inyección estereotáctica de partículas de ese vector. Aún queda por desarrollar la aplicabilidad de tales vectores en TGni dirigida al cerebro.

### Vectores no virales a base de nanopartículas

Casi un 70% de los ensayos clínicos actuales emplean vectores virales como vehículos de transferencia de ADN en células para reparación de genes defectuosos. Aunque los vectores virales resultan efectivos y son ampliamente usados, no es menos cierto que existen aún aspectos importantes de seguridad que hay que tener en cuenta cuando se emplean partículas virales en un programa terapéutico [41]. Debido a los evidentes efectos colaterales de los vectores virales, el objetivo real está en conseguir una terapia génica, eficiente, no invasiva y no viral para el cerebro. Ello requerirá soluciones multidisciplinarias entre diferentes campos, como ingeniería, química, biología celular, fisiología, farmacología y medicina. Aunque este escenario ideal no se ha conseguido aún, sí que hay hecho un trabajo considerable sobre estrategias de transferencia génica nanotecnológicas para cruzar la BHE.

Durante los últimos quince años hemos asistido al inicio de otra revolución científica, además de la terapia génica, basada en la capacidad de medir, manipular y organizar la materia en la escala del nanómetro. La nanotecnología se define como el conjunto de saberes y metodologías dirigidas a estudiar, fabricar y caracterizar estructuras funcionales con dimensiones inferiores a unas pocas decenas de nanómetros. La aplicación de la nanotecnología en la investigación biomédica está teniendo un importante impacto en el desarrollo de nuevos tipos de herramientas diagnósticas y terapéuticas. Un foco de atención clave es el desarrollo y uso de vectores no virales a base de nanopartículas, para lograr una transferencia génica segura y eficiente. Entre las mayores ventajas de los vehículos a nanoescala de transferencia de fármacos está su habilidad para cruzar las barreras de membrana, particularmente en el SNC. El término 'nanopartícula' se refiere a una estructura con un diámetro en el rango de 1 a 100 nm, encontrándose entre los primeros materiales a nanoescala que han sido directamente útiles en sistemas biológicos. Deben ser funcionalizadas de algu-

na manera para ser eficaces, lo que significa poder llenarse con, o acoplarse a, moléculas terapéuticas (como fármacos, ácidos nucleicos...) o marcarse con anticuerpos o ácidos nucleicos para facilitar la detección de una diana de interés. Pueden fabricarse a modo de nanocristales, complejos de fármaco-polímero o creando esferas a nanoescala (liposomas) que puedan atrapar moléculas de fármacos u otros agentes [42]. Las nanopartículas poliméricas han resultado efectivas en estudios de transferencia génica [43]. Son partículas coloidales que transportan fármacos/genes de interés dentro de una matriz de polímero biodegradable. Dependiendo del método de preparación, pueden obtenerse nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas constan de una matriz de polímero en el que el fármaco/gen está físicamente y uniformemente disperso, mientras que las nanocápsulas representan sistemas de transporte vesicular en los que el fármaco/gen está confinado en una cavidad rodeada de una matriz de polímero. Las nanopartículas poliméricas presentan una mejor eficiencia en términos de transporte de fármacos/genes comparadas con los métodos tradicionales orales e intravenosos [44]. Estas ventajas tienen su origen en dos propiedades básicas:

- Su pequeño tamaño favorece la penetración a través de pequeños capilares, lo que permite una mayor acumulación del fármaco/gen en el sitio diana [44]. Esto es particularmente relevante en el SNC, en el que el transporte de algunos fármacos es limitado, debido a su incapacidad para cruzar la BHE. La aplicación de nanopartículas como vehículos de transporte de fármacos/genes puede ayudar a superar dicho obstáculo. De hecho, se ha demostrado recientemente que las nanopartículas poliméricas son efectivas para el transporte de péptidos y otros agentes a través de la BHE [45,46].
- El uso de polímeros biodegradables favorece la liberación sostenida de fármacos/genes en el sitio diana durante un largo período [47].

Los dendrímeros son macromoléculas tridimensionales altamente ramificadas que rodean un núcleo central, y que pueden diseñarse a escala nanométrica con extraordinaria precisión. Los dendrímeros cuentan con varios extremos libres, a los que se pueden acoplar y ser transportadas moléculas de distinta naturaleza, desde agentes terapéuticos hasta moléculas fluorescentes. En su núcleo central pueden incorporarse diferentes moléculas de fármacos o ADN y, debido a su estructura ramificada, un solo dendrímero es capaz de transportar una cantidad elevada de moléculas, cuando se compara con otros sistemas de

transporte basados en nanopartículas. Múltiples grupos terminales que se localizan predominantemente en la superficie pueden controlar la interacción de las macromoléculas de dendrímero con su ambiente molecular. De hecho, los dendrímeros suelen contener más de 100 grupos terminales, dotados de amplios sitios reactivos, para permitir la conjugación con diferentes tipos de moléculas [48]. Además, dichos grupos terminales pueden modificarse para hacer hidrofóbico el interior y que su exterior permanezca hidrofóbico, o viceversa [49]. Recientemente se ha demostrado que los dendrímeros pueden ser vectores prometedores de transferencia génica en el cerebro. Más adelante daremos algunos ejemplos.

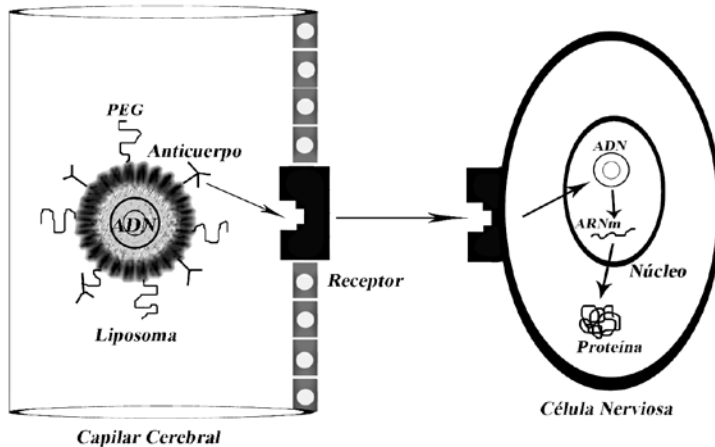
Los fulerenos son pequeñas esferas de pocos nanómetros de tamaño (nanoesferas), constituidas por átomos de carbono, ubicados de tal manera que forman estructuras nanométricas hexagonales y pentagonales. El fullereno más conocido es el carbono 60 (C-60), constituido por 60 átomos de carbono que forman una estructura similar a la de un balón de fútbol. Recientemente se ha descrito un fullereno soluble en agua, derivado del C-60, capaz de cruzar la membrana citoplasmática, y que se localiza preferentemente en la mitocondria [50]. Esto abre grandes perspectivas a la hora de poder realizar terapia génica mitocondrial. Las nanoesferas de carbono derivadas de glucosa son una clase emergente de vectores intracelulares. Las superficies de estas esferas están altamente funcionalizadas y no necesitan ninguna otra modificación. Además, la propiedad fluorescente intrínseca de las nanoesferas de carbono representa una ventaja a la hora de seguir su localización celular, sin necesidad de añadir marcas fluorescentes adicionales. Estas esferas pueden dirigirse al núcleo de las células de mamíferos, sin causar toxicidad [51]. Los experimentos *in vivo* han demostrado que estas nanoesferas pueden atravesar la BHE y localizarse en el cerebro, así como en el hígado y bazo [51,52]. Hay evidencia también de su continua remoción de estos tejidos durante el tiempo.

Aunque los vectores no virales basados en nanopartículas son fáciles de producir y tienen baja inmunogenicidad, hay cuestiones de toxicidad, especificidad, regulación de la expresión del transgén y eficiencia de transfección que deben ser resueltas antes de su aplicación clínica.

### Vía vascular: la ruta ideal

En terapia génica de enfermedades que afectan a extensas áreas del cerebro, la estrategia preferida sería administrar los vectores por vía sistémica. El cere-

**Figura 3.** Transferencia génica no invasiva en cerebro mediada por inmunoliposomas pegilados (ILP). El ADN plasmídico portador del gen terapéutico es encapsulado en el interior de un ILP. La superficie del liposoma se conjuga con varios miles de hebras de polietilenglicol (PEG) (para evitar la captación *in vivo* del ILP por el sistema reticuloendotelial e incrementar el tiempo de permanencia en la sangre), y las puntas de un 1-2% de las cadenas de PEG se acoplan a un ligando de focalización (suele ser un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor de insulina o transferrina de la barrera hematoencefálica). El ILP, conjugado al anticuerpo monoclonal, sufre transcitosis en la barrera hematoencefálica y, más tarde, una endocitosis mediada por receptor en la membrana plasmática de las células cerebrales, entrando entonces en el compartimento nuclear para promover la expresión de la proteína terapéutica.



bro humano contiene del orden de 100 millones de capilares que abarcan una superficie de aproximadamente 12 m<sup>2</sup> [53]. Prácticamente cada neurona del cerebro tiene su propio capilar, con una distancia media de capilar a neurona de 8-20 μm [54]. La administración de un gen terapéutico a neuronas a través de la membrana capilar sería entonces el método de elección. Sin embargo, hemos visto previamente que la BHE constituye un serio obstáculo a la entrada de macromoléculas en el cerebro.

El mecanismo básico acuñado por Pardridge como caballos troyanos moleculares consiste en que una proteína o ADN que va a cruzar la BHE es acoplada/conjugada a un ligando que es reconocido por un receptor que está presente en el lado luminal de las células endoteliales capilares del cerebro. Una vez en la sangre, el complejo proteína/ADN-ligando se une al receptor, llevándose a cabo un proceso de endocitosis. Dicho complejo se desplaza seguidamente por el citoplasma endotelial, evitando el sistema endosomal/lisosomal, para salir entonces por el lado abluminal (cerebral). Este sistema de transporte de proteínas a través de la BHE se ha empleado con éxito para el péptido intestinal vasoactivo, BDNF, factor de crecimiento epidérmico, pero también como inmunoliposomas pegilados (ILP) (Fig. 3)

que contienen ADN plasmídico expresando β-galactosidasa, tirosina hidroxilasa y GDNF, entre otros [55].

Hemos comentado previamente que la BHE posee mecanismos específicos de transporte mediados por receptores, que pueden aprovecharse como vía de transporte de fármacos/genes al cerebro. El receptor de transferrina es particularmente interesante, porque su expresión está restringida a los capilares cerebrales y a las membranas neuronales [56]. Para el direccionamiento cerebral con transportadores coloidales de genes se han utilizado fundamentalmente ILP (Fig. 3). La transferencia de inmunoliposomas pegilados desde la sangre al cerebro se consigue mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de transferrina o de insulina, los cuales, al unirse a sus respectivos ligandos, inducen la endocitosis mediada por receptor (transcitosis), incorporando posteriormente los genes exógenos en el parénquima cerebral sin dañar la BHE (Fig. 3). Con la administración intravenosa de inmunoliposomas pegilados, se ha conseguido expresar un gen antisentido en células de glioma humano, las cuales habían sido previamente intracerebralmente implantadas en ratón [57]. Asimismo, un plásmido de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) fue administrado por vía intravenosa (con inmunoliposomas pegilados) en un modelo de EP con 6-hidroxidopamina, apreciándose la normalización de los niveles de expresión de TH en el estriado [58].

Comparado con los liposomas, las nanopartículas pegiladas son física y químicamente más estables, pudiendo liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo. Las nanopartículas pegiladas conjugadas con albúmina catiónica (CBSA-NP) pueden emplearse también para la transferencia dirigida al cerebro [59]. En este sentido, se acumulan más CBSA-NP marcadas con una sonda fluorescente en células cerebrales de ratón (después de haberse inyectado intravenosamente) que cuando se emplean nanopartículas pegiladas conjugadas con albúmina nativa. Para terapia génica experimental no invasiva de gliomas, se han utilizado CBSA-NP en las que se ha incorporado un plásmido que expresa genes citotóxicos [60]. Con esto se ha demostrado por primera vez la transferencia en el cerebro de ratón de un gen citotóxico, usando una ruta no invasiva, para tratar un glioma maligno. También se han manufacturado inmunonanopartículas pegiladas mediante conjugación de un anticuerpo monoclonal antirreceptor de transferrina (OX26) a polietilenglicol (PEG)-poli(ácido láctico) (PLA), y que posibilitan la transferencia dirigida de medicinas génicas al cerebro [61].

En los últimos años, los dendrímeros de poli-amidamina (PAMAM) han emergido como una cla-



se nueva de polímeros esféricos nanoscópicos que han capturado el interés de investigadores de varias disciplinas científicas. Cada vez resulta más evidente que la PAMAM es un polímero multifuncional con diversas aplicaciones, como ser vehículos de transferencia para oligonucleótidos antisentido y de ARNsi [62]. Además, en sí misma, la PAMAM puede comportarse como un eficiente transportador de genes. Las PAMAM que poseen grupos de superficie amino primaria tienen la inherente habilidad de asociarse con y condensar ADN, habiéndose empleado eficientemente en transferencia biocompatible de ADN [63]. Una buena eficiencia de transfección se ha conseguido también modificando la superficie de la PAMAM con L-arginina. Las aminas primarias localizadas en la superficie de estos dendrímeros permiten la conjugación con algunos ligandos, como transferrina, para lograr una transferencia génica eficiente dirigida al cerebro. Con este objetivo, se ha desarrollado recientemente un vector para transferencia génica en el cerebro. Recordemos que el receptor de transferrina se expresa en la BHE y en la membrana neuronal [56]. La inyección intravenosa en ratón de un dendrímero nanoscópico altamente ramificado, modificado con transferrina y PEG (un polímero hidrofílico que aumenta la biocompatibilidad del vector) (PAMAM-PEG-Tf), induce una mayor expresión cerebral (casi el doble con respecto a otros vectores dendriméricos) de un gen exógeno encapsulado en dicho vector [64].

La administración intravenosa de dendrímeros de PAMAM conjugados a lactoferrina (Lf) mediante PEG bifuncional posibilita la expresión eficiente de genes exógenos en el cerebro. Como ligando dirigible al cerebro, la Lf puede unirse específicamente con los receptores de Lf de las células cerebrales. La Lf es una glicoproteína ligadora de hierro que pertenece a la familia de la transferrina. Una de las ventajas de la Lf, como ligando para terapia génica en cerebro, es la baja concentración plasmática de la Lf endógena (5 nM). Su concentración plasmática es mucho más baja que la kd de los receptores de Lf en la BHE [65]. Esto evita de una manera eficiente la inhibición competitiva de la Lf endógena con los sistemas de transferencia exógena de genes/drogas conjugados a Lf. Además, el transporte de Lf a través del modelo monocapa de BHE parece ser unidireccional, es decir, desde el lado apical al basolateral. Este transporte unidireccional podría producir una mayor acumulación neuronal de dichos sistemas de conjugados de Lf, si se compara con los conjugados de transferrina. Dichas ventajas se reflejan parcialmente en un reciente estudio, cuyos resultados muestran que la expresión génica exógena en el cerebro, me-

diada por nanopartículas acopladas a Lf, es casi 5,2 veces la obtenida con nanopartículas no conjugadas [66]. Con análisis de imagen *in vivo*, se ha descrito que la acumulación de nanopartículas de Lf era mayor en el cerebro (pero más baja en otros órganos) que la de sus contrapartidas no modificadas [67]. En un estudio reciente se han conseguido efectos neuroprotectores significativos con nanopartículas de Lf portadoras del gen *GDNF*, tras ser administradas intravenosamente, en un modelo de EP en rata inducido con la sustancia pesticida rotenona [68].

No obstante, la aplicación de los diferentes protocolos de transferencia ha estado limitada por la vida media de la proteína en circulación, por la necesidad de inyecciones repetidas o por los bajos rendimientos de transferencia conseguidos en el cerebro. El trabajo recientemente publicado por Spencer y Verma [69] da una posible solución a las primeras dos cuestiones.

La familia de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDLR) está formada por un grupo de receptores de superficie celular que unen complejos de lipoproteína para internalización en los lisosomas. Esta familia está compuesta por aproximadamente 10 receptores diferentes, que son expresados en tejidos específicos y que se unen principalmente a complejos de apolipoproteína. Las apolipoproteínas, cuyos miembros más representativos son la apolipoproteína B y la apolipoproteína E, se unen a lípidos de la sangre con objeto de dirigirlos a la degradación lisosomal. Las apolipoproteínas se unen a LDLR de la superficie celular en la célula diana, produciéndose entonces la endocitosis del complejo. En contraste, en la BHE, cuando la LDLR se une a apolipoproteínas, se provoca la transcitosis hacia el lado abluminal de la BHE y, presumiblemente, la apolipoproteína es liberada y captada por neuronas o astrocitos. Los autores antes señalados [69] usaron un vector lentiviral para transferir la enzima lisosomal glucocerebrosidasa y la forma secretada de la GFP a las neuronas y astrocitos del SNC. Para ello fusionaron a estas proteínas el dominio de unión a la LDLR de la apolipoproteína B, y añadieron una secuencia líder secretora para permitir su liberación. Fue necesaria una sola inyección intraperitoneal de vector lentiviral para que la proteína pudiera detectarse dos semanas más tarde en el SNC, demostrándose que había entrado por transcitosis mediante unión a la LDLR. Lo interesante de dicho enfoque terapéutico es que el vector lentiviral puede transferir también genes a un órgano periférico (hígado o bazo), los cuales sirven ahora de fuente para la expresión prolongada y continua, y para secreción, de una proteína terapéutica que tiene la habilidad de cruzar la

BHE. Esta técnica con LDLR puede emplearse para favorecer el paso de una cerebrosidasa a través de la BHE, lo que puede contribuir posiblemente a remediar algunas enfermedades cerebrales de almacenamiento lisosomal, como la enfermedad de Gaucher tipos 2 y 3, para las que actualmente no hay tratamiento efectivo. Pero quedan aún algunas cuestiones por resolver, como, por ejemplo, la inmunogenicidad de la proteína de fusión y la distribución cerebral restringida del LDLR, ya que sólo son transfectadas una minoría de células cerebrales. El primer problema será difícil de abordar, mientras que el segundo podrá posiblemente resolverse utilizando otros receptores que activan la transcitosis, como el receptor de la toxina diftérica [70].

### AAV9: el vector viral que cruza la barrera hematoencefálica

Recientemente se ha descrito la capacidad de los AAV tipo 9 (AAV9) de atravesar la BHE tras infusión intravenosa (tanto en ratones neonatos como adultos) y transducir amplias regiones del cerebro y la médula espinal [71]. Este hallazgo ha sido posteriormente corroborado por un segundo grupo independiente [72]. Los resultados conseguidos son de gran relevancia, dado el añejo interés por desarrollar vectores que pudiesen cruzar la BHE. Una sola inyección intravenosa de AAV9-GFP a ratones neonatos indujo una amplia transducción en las neuronas de todo el SNC; por ejemplo, se observó transducción en casi el 60% de las motoneuronas de la médula espinal, en cerca del 65% de las células de Purkinje, y en el 10-20% de las neuronas del córtex e hipocampo. La exposición diferencial de un receptor en la superficie celular podría explicar la propensión del virus por amplias neuronas del cerebro tras una inyección intravenosa. Sin embargo, la inyección intraparenquimatosa de vector afectaba a neuronas localizadas en regiones que eran pobremente transducidas después de la inyección sistémica, por ejemplo, las del estriado. Estos resultados han suscitado algunas cuestiones [73]: ¿qué papel desempeña la hemodinámica en la circulación del virus? y ¿las neuronas transducidas son simplemente un producto de la llegada a ellas de mayor flujo sanguíneo?

Los tipos celulares transducidos cambiaban de neuronal a glial cuando el AAV9-GFP era inyectado intravenosamente en animales adultos (Fig. 4). Así, se observó una transducción de astrocitos, y en menor proporción de células microgliales, en todo el SNC, y en casi un 60% de los astrocitos de la médula espinal. Es interesante resaltar que la transducción

glial mediada por AAV9 sólo se observaba después de la infusión intravenosa, mientras que la inyección intraparenquimatosa inducía el patrón de transducción neuronal clásico. ¿Por qué la transducción glial depende de la ruta de administración? Es posible que los receptores virales sean expresados sólo en los pies de astrocitos que cubren los vasos sanguíneos cerebrales, restringiendo, por ello, el acceso a las neuronas [74]. Aún queda por resolver el mecanismo de entrada de AAV9 en las células, pues entender la polaridad de la transducción astrocítica puede ayudar a determinar los receptores de AAV9.

En el estudio de Foust et al [71], parece que la administración periférica de AAV9 en el ratón adulto infecta astrocitos, una vez que el virus interactúa con los pies de astrocitos perivasculares que están en contacto directo con las células endoteliales vasculares (Fig. 4). Estas células pueden contener una población de receptores diferente de la expuesta cuando se realizan inyecciones directas en el parénquima cerebral, resultando singular las propiedades de transducción mediadas por AAV9. Incluso si pudiera abrirse la BHE en el adulto por vía farmacológica, se esperaría aún que las partículas de AAV de 80 nm no la crucen, impidiéndose el libre acceso a receptores potenciales de AAV en el parénquima cerebral [75].

El empleo de AAV9 puede tener importantes implicaciones para el tratamiento de varias enfermedades que afectan a extensas áreas del SNC. Entre éstas se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica, la EP y la enfermedad de Alzheimer.

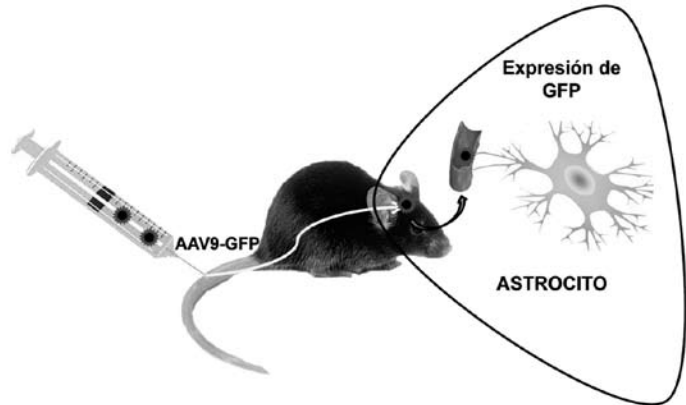
Una gran parte de los agentes terapéuticos propuestos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas son factores neurotróficos que se secretan, como IGF-1 y GDNF. Puesto que la mayoría de estos factores son secretados por la glía, es fácil imaginar que la sobreexpresión de factores tróficos mediada por AAV9 en estas células produciría una mejora significativa del rescate celular, similar o mejor a la encontrada cuando son las mismas neuronas las dianas terapéuticas. Para el caso de trastornos que requieran una administración más dirigida (por ejemplo, la EP), puede ser aún más ventajoso el uso intravenoso de AAV9, si se incluyeran promotores específicos de tejido en el constructo terapéutico.

### Hacia una terapia génica regulable

En el año 2006 empezaron a ensayarse tres estrategias de terapia génica en pacientes parkinsonianos, dos dirigidas a lograr beneficios sintomáticos direc-

tos y la otra orientada a impedir el curso natural de la enfermedad. En el primer estudio se transfiere el gen de la aminoácido aromático decarboxilasa (enzima que metaboliza levodopa a dopamina) al estriado de pacientes con EP, empleando para ello AAV2 [76]. Con ello se pretende optimizar la respuesta sintomática a la administración de levodopa, la cual podría así ser metabolizada a dopamina de forma más estable y constante. En un segundo enfoque se utiliza el mismo vector adenoasociado para transferir el gen de la ácido glutámico decarboxilasa al núcleo subtalámico. El objetivo consiste en facilitar la transmisión gabérgica en este centro, reduciendo así la sobreactivación de las neuronas glutamatérgicas subtalamonigrales que median en una parte sustancial de los trastornos característicos de la EP (de una manera análoga a la inducida con lesiones y con la estimulación cerebral profunda en este centro). Esta estrategia ha alcanzado también los ensayos clínicos en fase I [77]. La tercera aproximación consiste en inducir la sobreexpresión del gen de la neurturina mediante la inyección putaminal de AAV2-neurturina (también conocido como Cere-120) [78]. En animales, el Cere-120 no sólo incrementa la síntesis endógena de dopamina, sino que, además, protege a las neuronas dopaminérgicas de los efectos de diversos agentes neurotóxicos [79], rescatándolas del proceso degenerativo [80]. Todas estas aproximaciones emplean vectores constitutivos no regulables, por lo que en todos los casos la expresión del transgén, una vez introducido éste en el organismo, escapa a todo control externo –terapia génica no regulable (TGnr)–. Es cierto que con frecuencia los estudios animales muestran que las respuestas terapéuticas inducidas por la TGnr se alcanzan con dosis netamente inferiores a aquellas capaces de inducir efectos colaterales indeseables. De hecho, en las tres terapias génicas comentadas para la EP, las dosis con las que se pretenden obtener respuestas terapéuticas son netamente inferiores a aquellas para las cuales se esperarían efectos colaterales indeseables, lo cual sugiere un perfil de seguridad aceptable incluso cuando se emplean vectores constitutivos no regulables (aunque la evidencia disponible en humanos sólo consta de muestras relativamente pequeñas de pacientes que sólo han podido ser seguidos durante cortos períodos tras el tratamiento). A partir de estas consideraciones, y teniendo en cuenta que la extensa información disponible sobre AAV2 evidencia baja toxicidad, la falta de promotores regulables que se hayan probado como seguros y efectivos en pacientes, y las necesidades clínicas apremiantes de numerosas enfermedades neurológicas (particular-

**Figura 4.** Transferencia génica no invasiva en cerebro mediada por AAV9. En ratones adultos, la administración intravenosa de AAV9 permite a este serotipo cruzar el endotelio cerebral, pero no parece ir más allá de la barrera glial, transduciendo principalmente los astrocitos (infectando presumiblemente los pies terminales).



mente de la EP), algunos autores han sugerido que el uso de vectores regulables para la terapia génica humana es innecesario, y podría resultar incluso inadecuado y potencialmente peligroso [81]. Otros autores, no obstante, defienden la necesidad de utilizar promotores regulables siempre que sea posible, permitiendo así un control permanente de la expresión del transgén y que impida la aparición de daños imprevistos [82]. Existe poca información sobre las consecuencias de la sobreexpresión sostenida (de meses a años) o inespecífica (neuronas y glía) de genes particulares, lo cual es especialmente relevante en el caso de proteínas que, como los factores neurotróficos, disponen de receptores ampliamente distribuidos por el SNC. Por ello, es previsible que en los próximos años los ensayos clínicos de terapia génica comiencen a utilizar vectores regulables –terapia génica regulable (TGr)– [82], lo cual permitiría ajustar la expresión del transgén hasta alcanzar su máxima eficacia biológica con el menor riesgo de efectos adversos.

En los vectores regulables, la expresión del transgén está acoplada a un conmutador transcripcional (en lugar de estar bajo el control de un promotor constitutivo) cuya actividad puede ser regulada por un producto químico exógeno. En animales se han probado varios sistemas de promotores regulables por agentes como la tetraciclina (tet), la rapamicina, la mifepristona y la ecdisona. Los sistemas regulables más conocidos son los tet, los cuales se han mostrado eficientes y seguros para controlar la expresión de transgenes en modelos experimentales

de diversas enfermedades neurológicas [83-85]. Se han desarrollado sistemas tet capaces de promover la activación (tet-ON) o la inactivación (tet-OFF) de la expresión génica, sistemas que han sido incorporados en lentivirus, virus adenoasociados, adenovirus de primera generación o de alta capacidad, y retrovirus. La elección del sistema tet depende de la secuencia temporal de activación del transgén que resulte preferible en cada caso. Si se desea una expresión sostenida del transgén, es mejor utilizar tet-OFF, mientras que el tet-ON podría resultar más conveniente para la expresión del transgén durante ventanas temporales más cortas, lo cual minimizaría el tiempo de exposición de los pacientes a agentes químicos no exentos de toxicidad. Además de suponer un mecanismo de seguridad contra la sobreexpresión descontrolada, la regulación de la actividad del transgén podría permitir una flexibilidad en el control de la respuesta terapéutica, difícilmente alcanzable por otros procedimientos. Las condiciones clínicas de los pacientes habitualmente cambian con el curso de la enfermedad [86], con lo que el ajuste de la dosis de TGr podría resultar clave para su utilidad a largo plazo. Dado que el grado de la lesión es específico para cada paciente, la respuesta a la terapia génica podría variar notablemente entre los distintos pacientes, por lo que la incorporación de un mecanismo a prueba de fallos (en este caso de un vector regulable) podría resultar crítica para el tratamiento de algunos pacientes. Con el desarrollo de biomarcadores podrían comenzar a tratarse enfermedades neurodegenerativas antes de la aparición de sus primeros síntomas. Un sistema regulable posibilitaría el desarrollo de una sola construcción génica, cuya expresión podría ajustarse a las necesidades cambiantes de cada paciente. Además, se están desarrollando sistemas avanzados que permiten la regulación de múltiples transgenes introducidos en el mismo vector y controlados independientemente por diferentes agentes inductores [87,88]. Con ello se podría desarrollar una TGr compleja, en la que múltiples transgenes (por ejemplo, para varios factores neurotróficos) podrían actuar sinérgicamente sobre distintas dianas terapéuticas.

A pesar de las numerosas ventajas potenciales de la TGr, su uso clínico precisa aún de estudios básicos pormenorizados. Hay retos pendientes de resolver antes de que la TGr pueda convertirse en una herramienta terapéutica eficiente y segura. Éste es el caso de la inhibición de la expresión de transgenes regulables en *off* (como tet-OFF), que podrían tener efectos tóxicos incluso con baja expresión sostenida. También habrá que optimizar la penetración del agente modulador de la expresión en el tejido/

órgano diana. Por último, son necesarios más estudios para determinar si el sistema inmune puede reconocer componentes del sistema de regulación de la expresión del transgén, lo cual podría ser particularmente relevante en los casos en los que, como ocurre con tet-ON, la expresión ha de mantenerse durante largos períodos (como ocurriría en el tratamiento de enfermedades neurológicas crónicas).

### Hacia una terapia génica no invasiva

La administración directa de los transgenes en el tejido neuronal (TGi) aporta ventajas para el tratamiento de algunas enfermedades neurológicas, ya que evita la expresión periférica del transgén (y la correspondiente activación inmunológica), así como su expresión central generalizada (innecesaria en enfermedades neurológicas focales). No obstante, la TGi también presenta notables desventajas, entre las que destaca el uso de procedimientos quirúrgicos (con daño de la BHE, gliosis reactiva inespecífica, riesgo de infecciones...) que no pueden ser repetidos con frecuencia en el caso de enfermedades crónicas. Además, esta modalidad de administración suele inducir efectos muy intensos en las regiones cerebrales inyectadas, pero insuficientes en el tejido circundante (disminución exponencial de la expresión del transgén con la distancia al punto de inyección), dificultado así el ajuste de la dosis terapéutica. Por el contrario, la TGni permite una mayor distribución del transgén en el cerebro (particularmente útil en enfermedades con afectación cerebral difusa) y no precisa cirugía, posibilitando su administración repetida en enfermedades neurológicas crónicas (la expresión más duradera del transgén ha sido comunicada para AAV y siempre ha sido inferior a 10-15 meses).

Todos los ensayos clínicos de terapia génica para el tratamiento de la EP han acudido a la TGi, lo cual tiene sentido cuando el objetivo terapéutico está dirigido a prevenir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas o a tratar los síntomas primarios asociados a un centro motor específico. Sin embargo, cada vez resulta más evidente que desde su estadio inicial, la EP afecta a poblaciones neuronales no dopaminérgicas de diversos centros cerebrales (corteza cerebral, bulbo olfatorio, núcleo pedunculopontino, *locus coeruleus*...), induciendo síntomas que van mucho más allá de los trastornos motores inicialmente asociados a la transmisión dopaminérgica (trastornos neurovegetativos, demencia, trastornos atencionales, alteraciones del sueño, depresión...). Por ejemplo, el sustrato anatómico de la depresión

se ha asociado a alteraciones de la transmisión noradrenérgica, serotoninérgica y dopaminérgica en diversos centros como el *locus coeruleus*, los núcleos del rafe, y diversos centros de los ganglios basales y del sistema límbico [89,90]. Si bien en la EP sin demencia los deterioros cognitivos están asociados a anomalías en la transmisión dopaminérgica de la corteza cerebral y en el estriado ventral [91], la EP con demencia incluye trastornos en la transmisión colinérgica cortical [92]. Por tanto, la futura terapia génica de esta enfermedad debería dirigirse no sólo a los centros dopaminérgicos asociados con los trastornos motores, sino también a otros centros y otros neurotransmisores. Desde esta perspectiva, la mayor extensión de los efectos de la TGni (en relación con la TGi) podría resultar particularmente conveniente en pacientes con afectación central generalizada, acciones terapéuticas que difícilmente podrían alcanzarse mediante TGi.

## Conclusiones

El desarrollo de nuevos serotipos de vectores adeoasociados con capacidad de transducir células del SNC tras ser inyectados periféricamente, de una generación de vectores lentivirales con un fenotipo no integrativo, y de una gama de nanopartículas funcionalizadas con capacidad también de cruzar la BHE está teniendo un importante impacto en el desarrollo y uso de herramientas terapéuticas más seguras y eficientes. Habiéndose cruzado el Rubicón, se esperan entonces los siguientes retos, por ejemplo, producir vectores eficientes con promotores regulables, reducir la transducción de órganos periféricos, dirigir los vectores a poblaciones neuronales y gliales concretas, y demostrar la reversión de varias enfermedades cerebrales. La administración de medicamentos terapéuticos para el tratamiento de trastornos del SNC es un problema común compartido por farmacólogos y terapeutas de genes, pero el campo de la transferencia génica no invasiva en el SNC puede encontrarse al borde de un excitante paso adelante. Los estudios ya realizados en animales resultan altamente prometedores, y es probable que, en los próximos años, den lugar a procedimientos de terapia génica útiles y seguros para su uso en pacientes.

## Bibliografía

- Loch-Neckel G, Koepp J. La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol* 2010; 51: 165-74.
- Tenenbaum L, Chertko A, Lehtonen E, Blum D, Baekelandt V, Velu T, et al. Neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease. *Curr Gene Ther* 2002; 2: 451-83.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2009; 15: 331-7.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 346-58.
- Mejía-Toiber J, Castillo CG, Giordano M. Terapia celular y terapia génica *ex vivo*: avances en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. *Rev Neurol* 2009; 49: 483-9.
- Kaiser J. Gene therapy. RAC's advice: proceed with caution. *Science* 2002; 298: 2113-5.
- Essner JJ, McIvor RS, Hackett PB. Awakening gene therapy with sleeping beauty transposons. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 513-9.
- Conwell CC, Huang L. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv Genet* 2005; 53: 3-18.
- Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 893-5.
- Pathak A, Patnaik S, Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnol J* 2009; 4: 1559-72.
- Tenenbaum L, Chertko A, Lehtonen E, Blum D, Baekelandt V, Velu T, et al. Neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease. *Curr Gene Ther* 2002; 4: 451-83.
- Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 1995; 17: 237-45.
- Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol* 1968; 88: 368-78.
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 1983; 45: 555-64.
- Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; 72: 2224-32.
- Zolotukhin S. Production of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 551-7.
- Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, Kroeger K, Castro MG. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr Gene Ther* 2007; 7: 347-60.
- Wang Z, Storb R, Lee D, Kushmerick MJ, Chu B, Berger C, et al. Immune responses to AAV in canine muscle monitored by cellular assays and noninvasive imaging. *Mol Ther* 2010; 18: 617-24.
- Paterna JC, Büeler H. Recombinant adeno-associated virus vector design and gene expression in the mammalian brain. *Methods* 2002; 28: 208-18.
- Manfredsson FP, Rising AC, Mandel RJ. AAV9: a potential blood-brain barrier buster. *Mol Ther* 2009; 17: 403-5.
- Burger C, Gorbatyuk O, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 2004; 10: 302-17.
- Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3428-32.
- Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 2000; 886: 82-98.
- Cearley CN, Vandenberghe LH, Parente MK, Carnish ER, Wilson JM, Wolfe JH. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol Ther* 2008; 16: 1710-8.

25. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998; 72: 1438-45.
26. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999; 5: 71-7.
27. McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J, Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Ther* 2009; 16: 1340-52.
28. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999; 5: 78-82.
29. Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, et al. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 2001; 276: 20610-6.
30. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, et al. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 2003; 9: 1306-12.
31. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 2008; 16: 1073-80.
32. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
33. Rohll JB, Mitrophanous KA, Martin-Rendon E, Ellard FM, Radcliffe PA, Mazarakis ND, et al. Design, production, safety, evaluation, and clinical applications of nonprimate lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 2002; 346: 466-500.
34. Déglon N, Hantraye P. Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J Gene Med* 2005; 7: 530-9.
35. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11382-8.
36. Lundberg C, Björklund T, Carlsson T, Jakobsson J, Hantraye P, Déglon N, et al. Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders. *Curr Gene Ther* 2008; 8: 461-73.
37. Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan CV, Vasconcellos AV, Thanos CG. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays* 2005; 27: 262-74.
38. Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 65-82.
39. Regev L, Ezrielev E, Gershon E, Gil S, Chen A. Genetic approach for intracerebroventricular delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 4424-9.
40. Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17684-9.
41. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 346-58.
42. LaVan DA, McGuire T, Langer R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1184-91.
43. Cohen H, Levy RJ, Gao J, Fishbein I, Kousaev V, Sosnowski S, et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther* 2000; 7: 1896-05.
44. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70: 1-20.
45. Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res* 2003; 20: 409-16.
46. Nahar M, Dutta T, Murugesan S, Asthana A, Mishra D, Rajkumar V, et al. Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2006; 23: 259-18.
47. Tang BC, Dawson M, Lai SK, Wang YY, Suk JS, Yang M, et al. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 19268-73.
48. Jain NK, Gupta U. Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4: 1035-52.
49. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today* 2003; 8: 1112-20.
50. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 116-9.
51. Selvi BR, Jagadeesan D, Suma BS, Nagashankar G, Arif M, Balasubramanyam K, et al. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo. *Nano Lett* 2008; 8: 3182-8.
52. Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L, et al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nat Nanotechnol* 2008; 3: 363-8.
53. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 247-79.
54. Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res* 1999; 58: 312-28.
55. Zhang Y, Pardridge WM. Near complete rescue of experimental Parkinson's disease with intravenous, non-viral GDNF gene therapy. *Pharm Res* 2009; 26: 1059-63.
56. Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 1984; 312: 162-3.
57. Zhang Y, Jeong Lee H, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 2002; 4: 183-94.
58. Zhang Y, Calon F, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1-12.
59. Lu W, Tan YZ, Hu KL, Jiang XG. Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier. *Int J Pharm* 2005; 295: 247-60.
60. Lu W, Sun Q, Wan J, She Z, Jiang XG. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumors via intravenous administration. *Cancer Res* 2006; 66: 11878-87.
61. Olivier JC, Huertas R, Lee HJ, Calon F, Pardridge WM. Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm Res* 2002; 19: 1137-43.
62. Kang H, DeLong R, Fisher MH, Juliano RL. Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides. *Pharm Res* 2005; 22: 2099-106.
63. Kim TI, Seo HJ, Choi JS, Jang HS, Baek JU, Kim K, et al. PAMAM-PEG-PAMAM: novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier. *Biomacromolecules* 2004; 5: 2487-92.
64. Huang RQ, Qu YH, Ke WL, Zhu JH, Pei YY, Jiang C. Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *FASEB J* 2007; 21: 1117-25.
65. Huang RQ, Ke WL, Qu YH, Zhu JH, Pei YY, Jiang C. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain. *J Biomed Sci* 2007; 14: 121-8.
66. Huang R, Ke W, Liu Y, Jiang C, Pei Y. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain. *Biomaterials* 2008; 29: 238-46.
67. Huang R, Ke W, Han L, Liu Y, Shao K, Jiang C, et al. Lactoferrin-modified nanoparticles could mediate efficient gene delivery to the brain in vivo. *Brain Res Bull* 2010; 81: 600-4.
68. Huang R, Ke W, Liu Y, Wu D, Feng L, Jiang C, et al. Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in

- a rotenone-induced chronic Parkinson model. *J Neurol Sci* 2010; 290: 123-30.
69. Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7594-9.
  70. De Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 323-55.
  71. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernández A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 59-65.
  72. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 2009; 17: 1187-96.
  73. Saunders NR, Joakim Ek C, Dziegielewska KM. The neonatal blood-brain barrier is functionally effective, and immaturity does not explain differential targeting of AAV9. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 804-5.
  74. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 5-23.
  75. Manfredsson FP, Rising AC, Mandel RJ. AAV9: a potential blood-brain barrier buster. *Mol Ther* 2009; 17: 403-5.
  76. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70: 1980-3.
  77. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; 369: 2097-105.
  78. Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, et al. Safety and tolerability of intraputaminar delivery of CER-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 2008; 7: 400-8.
  79. Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell III J, Gasmi M, et al. Delivery of neurturina by AAV2 (AAV2-NEURTURIN)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 2006; 60: 706-15.
  80. Herzog CD, Dass B, Holden JE, Stansell J 3rd, Gasmi M, Tuszynski MH, et al. Striatal delivery of CER-120, an AAV2 vector encoding human neurturina, enhances activity of the dopaminergic nigrostriatal system in aged monkeys. *Mov Disord* 2007; 22: 1124-32.
  81. Kordower JH, Olanow CW. Regulatable promoters and gene therapy for Parkinson's disease: is the only thing to fear, fear itself? *Exp Neurol* 2008; 209: 34-40.
  82. Cress DE. The need for regulatable vectors for gene therapy for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2008; 209: 30-3.
  83. Régulier E, Trotter Y, Perrin V, Aebischer P, Déglon N. Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2827-36.
  84. Blesch A, Conner J, Pfeifer A, Gasmi M, Ramírez A, Britton W, et al. Regulated lentiviral NGF gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons. *Mol Ther* 2005; 11: 916-25.
  85. Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B, Winkler J, Von Horsten S, Schmidt T, et al. Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2008; 28: 2471-84.
  86. Collier TJ, Lipton J, Daley BF, Palfi S, Chu Y, Sortwell C, et al. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. *Neurobiol Dis* 2007; 26: 56-65.
  87. Kumar MB, Potter DW, Hormann RE, Edwards A, Tice CM, Smith HC, et al. Highly flexible ligand binding pocket of ecdysone receptor: a single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists. *J Biol Chem* 2004; 279: 27211-8.
  88. Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JE, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005; 12: 189-211.
  89. Levy R, Dubois B. Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex* 2006; 16: 916-28.
  90. Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 2005; 128: 1314-22.
  91. Owen AM, Sahakian BJ, Semple J, Polkey CE, Robbins TW. Visuo-spatial short-term recognition memory and learning after temporal lobe excisions, frontal lobe excisions or amygdalo-hippocampectomy in man. *Neuropsychologia* 1995; 33: 1-24.
  92. Klein JC, Eggers C, Kalbe E, Weisenbach S, Hohmann C, Vollmar S, et al. Neurotransmitter changes in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia in vivo. *Neurology* 2010; 74: 885-92.

## Non invasive gene therapy in neurological diseases

**Introduction.** Brain gene therapy consists of introducing nucleic acids into nerve tissue whose expression may prove to be therapeutically useful. This genetic material is indirectly introduced by means of non invasive gene therapy into the blood thereby avoiding its direct injection into the brain and the damage to the blood brain barrier.

**Aim.** The different non invasive vectors and means of gene transfer to the central nervous system will be discussed.

**Development.** There has been a remarkable breakthrough in recent years in non invasive gene transfer strategies into the central nervous system. The development of new serotypes of adenoassociated vectors, such as AAV9, and of functionalized nanoparticles, such as pegylated immunoliposomes, polymeric nanoparticles, pegylated nanoparticles, dendrimers, fullerenes, as well as specific transporters specific to the low density lipoprotein receptor family, means that it is now possible to introduce and express gene material in nerve tissue following peripheral administration of the above mentioned vectors.

**Conclusions.** Non invasive gene therapy entails exciting new perspectives for the treatment of the numerous neurological diseases for which there are no effective pharmacological treatments. Studies already performed on animals have proved to be highly promising and it is likely that, in the next few years, they will give rise to non invasive gene therapy procedures which will be useful and safe for treating patients.

**Key words.** AAV9. Blood brain barrier. Brain. Gene therapy. Nanoparticles. Neurodegenerative diseases. Viral vectors.