

FACULTAD DE MEDICINA  
TRABAJO DE FIN DE GRADO



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA



# TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

---

GENE THERAPY IN NEURODEGENERATIVE DISEASE

GRADO EN MEDICINA

Departamento de Biología Celular y Patología

Autora: Nerea García González

Tutora: María Dolores E. López García

Año 2024

*“En la ciencia, a menudo encontramos que, al sumergirnos en los detalles más minuciosos, descubrimos la belleza y complejidad del panorama general.”*

*A Juanjo y a Lita.*

# ÍNDICE

---

---

<b>Resumen</b> .....	7
<b>1. Introducción</b> .....	9
1.1. Enfermedades neurodegenerativas .....	9
1.1.1. Enfermedad de Alzheimer .....	9
1.1.2. Enfermedad de Parkinson .....	9
1.1.3. Atrofia muscular espinal .....	10
1.1.4. Enfermedad de Huntington .....	11
1.1.5. Esclerosis lateral amiotrófica .....	11
1.2. Terapia génica .....	12
1.2.1. Niveles de intervención del tratamiento genético de las enfermedades ..	12
1.2.2. Rutas y vías de administración .....	15
1.2.3. Limitaciones de la transferencia de genes .....	16
<b>2. Justificación</b> .....	17
<b>3. Hipótesis y objetivos</b> .....	17
3.1. Hipótesis .....	17
3.2. Objetivos .....	18
<b>4. Material y método</b> .....	18
4.1. Material .....	18
4.2. Procedimiento .....	19
4.3. Análisis de la información .....	21
<b>5. Resultados</b> .....	22
5.1. Terapias con intención curativa .....	32
5.2. Terapias con intención modificadora .....	34
<b>6. Discusión</b> .....	35
<b>7. Conclusiones</b> .....	38
<b>8. Referencias bibliográficas</b> .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

Tabla 1: Técnicas utilizadas para el tratamiento genético de las enfermedades. ....	14
Tabla 2 Criterios de inclusión y exclusión .....	20
Tabla 3: Resultados: atrofia muscular espinal.....	24
Tabla 4: Resultados: enfermedad de Huntington .....	26
Tabla 5: Resultados: esclerosis lateral amiotrófica .....	27
Tabla 6: Resultados: enfermedad de Parkinson.....	28
Tabla 7: Resultados: enfermedad de Alzheimer.....	31
Figura 1. Vías de administración de las técnicas de terapia génica según su biodistribución e invasividad.....	16
Figura 2. Estrategia PICor .....	19
Figura 3. Diagrama de flujo de búsqueda.....	22
Figura 4. Análisis de los resultados .....	32

## ABREVIATURAS

---

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina

**AAV:** vectores adenoasociados

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AME:** atrofia muscular espinal

**APP:** gen de la proteína precursora beta amiloide

**ASOs:** oligonucleótidos antisentido

**BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro

**BHE:** barrera hematoencefálica

**CAPE:** éster fenético del ácido cafeico

**CAV-1:** caveolina-1

**CRISPR:** secuencias palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

**EA:** enfermedad de Alzheimer

**EH:** enfermedad de Huntington

**ELA:** esclerosis lateral amiotrófica

**ENDs:** enfermedades neurodegenerativas

**EP:** enfermedad de Parkinson

**FDA:** Food and Drug Administration

**FUS:** ultrasonidos de alta frecuencia

**GDNF:** factor neurotrófico derivado de la glía

**HCNDF:** factor neurotrófico dopaminérgico humano cerebral

**HSCs:** células madre hematopoyéticas

**hIDPSC:** células madre derivadas de la pulpa dental inmadura humana

**HTT:** proteína huntingtina

**iARNm:** ARN mensajero de interferencia

**ICV:** intracerebroventricular

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IV:** intravenoso

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**lncRNA:** RNA largo no codificante

**LRRK2:** gen de la enzima quinasa rica en leucina 2

**MAPT:** gen de la proteína asociada a microtúbulos Tau

**miHTT:** microARN dirigido a HTT

**miRNA:** microARN

**mRNA:** RNA mensajero

**MSCs:** células madre mesenquimales

**MTF1:** factor de transcripción sensible al metal

**MPTP:** 1-metil-4-1,2,3,6-tetrahidropiridina

**Nlk:** quinasa tipo nemo

**PARK7:** gen de la deglicasa asociada a parkinsonismo

**PSCi:** células madre progenitoras inducidas

**PSENI-2:** gen de la presenilina 1 y 2

**PTEN:** gen homólogo de fosfatasa y tensina

**RSL:** revisión sistemática de la literatura

**shRNA:** ARN de horquilla corta

**SMNI:** gen de supervivencia neuronal

**SNCA:** gen de interacción con la membrana  $\alpha$ -sinucleína

**SNpc:** sustancia negra pars compacta

**SOD 1:** superóxido dismutasa 1

**SYT 13:** sinaptotagmina 13

**TH:** tirosina hidroxilasa

**TDP-43:** proteína de unión al ADN de respuesta transactiva de 43kDa

**UCB-MCs:** células mononucleares derivadas del cordón umbilical

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular

# Resumen

Analizamos el uso de las terapias génicas como medio para desarrollar nuevos tratamientos en las enfermedades neurodegenerativas, evaluando los niveles de intervención del tratamiento génico, las vías de administración y sus limitaciones en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Comprobamos si las terapias génicas en enfermedades neurodegenerativas son efectivas, tanto en las enfermedades monogénicas como en las poligénicas, individualizando las técnicas utilizadas según la patogenia de la enfermedad. Siguiendo las directrices del procedimiento PRISMA, procedemos a la revisión de los trabajos publicados desde 2020, utilizando la estrategia PICO para obtener conclusiones fiables. Se analizaron los resultados obtenidos con las diferentes terapias aplicadas a diferentes enfermedades neurológicas como Parkinson (n=12), Atrofia Muscular Espinal (n=8), enfermedad de Huntington (n=3), Alzheimer (n=3) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (n=6), describiendo en cada una el tipo de terapia, su intención curativa o modificadora, los procedimientos de administración, las ventajas y desventajas y los efectos secundarios. Comprobamos que, efectivamente, las terapias génicas basadas en la introducción, eliminación o modificación de la expresión de un gen parecen ser efectivas en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en aquéllas de etiología monogénica, ofreciendo esperanzas de logros clínicos en los próximos años. En el resto de las enfermedades neurodegenerativas de base poligénica, o en aquellas monogénicas en las que la diana no es sensible, los tratamientos están enfocados a actuar sobre la supervivencia celular. Además, se comprobó que las terapias que administran vectores por vía intracerebral presentan una mayor eficacia, aunque su elevada invasividad favorece el desarrollo de otras técnicas de administración, siendo la intravenosa y la intratecal las más empleadas. A pesar de las dificultades que expresan los trabajos realizados, se muestra un futuro prometedor para las terapias génicas y la necesidad de más investigación en este ámbito para lograr tratamientos específicos y más efectivos para cada una de las enfermedades neurodegenerativas analizadas.

**Palabras clave:** Atrofia Muscular Espinal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa, Esclerosis Lateral Amiotrófica, terapia génica.

# Abstract

The present study examines the use of gene therapies as a means to develop novel treatments for neurodegenerative diseases, assessing the levels of intervention of gene therapy, the routes of administration, and their limitations in different neurodegenerative diseases. The initial hypothesis posits the utility of gene therapies in treating neurodegenerative diseases, being more effective in monogenic ones, tailoring the techniques used according to the disease's pathogenesis. Following the PRISMA procedure guidelines, studies from 2020 were reviewed, using the PICO strategy to obtain reliable conclusions. The results obtained with the different therapies applied to Parkinson's disease (n=12), Spinal Muscular Atrophy (n=8), Huntington's disease (n=3), Alzheimer's disease (n=3), and Amyotrophic Lateral Sclerosis (n=6) were analysed, describing the type of therapy, its curative or modifying intention, administration procedures, advantages and disadvantages, and side effects for each. It was found that indeed, gene therapies involving gene introduction or elimination appear to be effective in various neurodegenerative diseases, especially those of monogenic etiology, offering prospects for clinical achievements in the coming years. In polygenic-based diseases, efforts are directed towards cell survival. In polygenic diseases, the translation of therapies performed in animal models to humans is challenging. Additionally, the greater efficacy of therapies administered intracerebrally was confirmed, although they are highly invasive. Despite the challenges expressed in the studies conducted, a promising future for gene therapies is demonstrated, emphasizing the need of further research in this field to achieve specific treatments for each of the analysed neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, gene therapy, Huntington's disease, neurodegenerative disease, Parkinson's disease, Spinal Muscular Atrophy.



# 1. Introducción

## 1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) son un conjunto de enfermedades que afectan al sistema nervioso caracterizadas por su significativo impacto y prevalencia en la raza humana<sup>1</sup>. Carecen de tratamiento curativo y tienen un pronóstico nefasto<sup>2</sup>. En el caso de las ENDs de etiología genética, el estudio de los patrones de expresión génica e identificación de alteraciones moleculares mediante las técnicas de secuenciación masiva permite clasificarlas de la siguiente manera<sup>3</sup>:

- Enfermedades monogénicas: Enfermedad de Huntington (EH) y Atrofia muscular espinal (AME).
- Enfermedades poligénicas: Enfermedad de Alzheimer (EA), Enfermedad de Parkinson (EP) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

### 1.1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más prevalente de demencia, afectando a un 3-5% de los mayores de 65 años<sup>4</sup>. La presentación familiar (<5%) posee mutaciones en genes específicos como gen de la proteína precursora beta amiloide, *APP*, gen de la presenilina 1 y 2, *PSENI-2*, y gen de la proteína Tau asociada a microtúbulos, *MAPT*, mientras la patogenia de la forma esporádica (95%) aún es desconocida. El acúmulo de placas  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y ovillos de tau hiperfosforilada en córtex causa la pérdida de memoria y cambios conductuales que caracterizan a esta enfermedad, produciendo un deterioro que progresa hasta alcanzar la muerte tras 5-12 años del diagnóstico<sup>5</sup>. Se ha demostrado el papel fundamental que desempeña la microglía, cuya inflamación constituye un factor contribuyente debido a la liberación de citoquinas proinflamatorias, que aumentan la síntesis de placas seniles y, por lo tanto, la disfunción sináptica<sup>5</sup>.

### 1.1.2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), el segundo trastorno neurodegenerativo en frecuencia, se caracterizan por presentar temblor en reposo, bradicinesia e inestabilidad postural asociados a anomalías cognitivas<sup>6,7</sup>. La disfunción motora está producida por la

pérdida progresiva de neuronas y circuitos dopaminérgicos en la sustancia negra pars compacta (SNpc)<sup>8, 9, 10</sup>. La EP puede ser esporádica (10-15%), donde predomina la interacción genética-ambiente, o familiar (85-90%), donde se han identificado los siguientes genes<sup>11</sup>:

- Gen de interacción con la membrana  $\alpha$ -sinucleína (*SNCA*): codifica la proteína presináptica  $\alpha$ -sinucleína, cuya agregación favorece la formación de cuerpos de Lewy y agregados endógenos de sinucleína<sup>12</sup>.
- Genes de control de calidad mitocondrial como el gen homólogo de fosfatasa y tensina, *PTEN* y el gen que codifica la enzima quinasa rica en leucina 2, *LRRK2*<sup>11, 13</sup>.
- Genes de control de daño oxidativo, como el gen que codifica la deglicasa asociada a parkinsonismo, *PARK7*, y gen que codifica la enzima lisosomal glucosylceramidasa Beta 1, *GBA1*, que condicionan el acúmulo de glucocerebrosidasa por aumento de actividad de la vía de las quinasas mTor, provocando acúmulos de sinucleína<sup>14</sup>.

Estudios posteriores han identificado otros genes que intervienen en la severidad del fenotipo, aunque es la pérdida de neuronas de la SNpc el factor de pronóstico más importante<sup>10</sup>. Al igual que sucede en la enfermedad de Alzheimer, la microglía participa activamente en el metabolismo de la dopamina, ya que, aunque carece de la enzima tirosina hidroxilasa y, por lo tanto de capacidad intrínseca de su síntesis, tiene la capacidad de convertir el aminoácido tirosina a su forma activa mediante una descarboxilasa<sup>8, 15</sup>.

Existen dos terapias frecuentemente utilizadas, los fármacos basados en la reposición de L-dopa, con eficacia máxima de 5 años<sup>8, 15, 16</sup>, y la estimulación cerebral profunda<sup>6</sup>, ambas destinadas a aliviar los síntomas<sup>17</sup>.

### 1.1.3. Atrofia muscular espinal

La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva caracterizada por una mutación bialélica del gen de supervivencia neuronal, *SMN1*, que se encuentra en el cromosoma 5q13<sup>18</sup>. Es la principal causa de mortalidad infantil de origen genético, provocando una deficiencia proteica que resulta

en la degeneración progresiva de las motoneuronas, conduciendo a una importante debilidad y atrofia muscular<sup>1, 19</sup>. La gravedad del fenotipo está determinada por el número de copias de SMN2 funcional que expresa el paciente, relevando la función de la SMN1 deficitaria<sup>20</sup>, lo que condiciona la edad de presentación y el pronóstico, siendo el tipo 1 el más grave y mortal, con una esperanza de vida máxima de 2 años<sup>18, 21</sup>.

Sin tratamiento, la AME tiene un pronóstico fatal y los tratamientos convencionales son paliativos<sup>22</sup>.

#### 1.1.4. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno degenerativo hereditario caracterizado por la expansión de tripletes CAG en el primer exón del gen *HTT* localizado en el cromosoma 4q, considerándose patológica la presencia de más de 36 tripletes; originando, mediante repetición del aminoácido glutamina, la producción de una proteína anómala llamada huntingtina (HTT)<sup>23</sup>. Esta proteína regula la homeostasis del transporte vesicular axonal y, por lo tanto, los agregados de HTT se distribuyen ampliamente<sup>24</sup>, causando una degeneración extensa del córtex y ganglios basales<sup>25</sup>, afectando tanto a aspectos motores como cognitivos y comportamentales<sup>18</sup>. La gravedad del fenotipo empeora con el número de repeticiones de glutamina<sup>27</sup>.

Hoy en día, la supervivencia tras el diagnóstico es de unos 15-20 años.

#### 1.1.5. Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una ENDs de las motoneuronas que afecta predominantemente a adultos entre 50 y 70 años<sup>27</sup>. Existen dos formas de presentación: ELA familiar (20%) y ELA esporádica (80%)<sup>28</sup>. En ambas, aunque en mayor medida la forma familiar, la agregación de proteínas anormales y su precipitación son causantes de la citotoxicidad que provoca la degeneración neuronal y se asocia frecuentemente a la mutación del gen de la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), causando acumulación de SOD1 anormal<sup>29</sup>, y a la mutación del gen *TDP-43* (TAR DNA-Binding Protein 43), que codifica la proteína TDP-43. Esta última, reguladora del *splicing*, origina alteraciones a nivel de neurotransmisores como el GABA<sup>30</sup>. La formación de agregados citoplasmáticos pueden expandirse de un modo parecido a los priones, y se encuentran en otras enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Huntington, lo que significa que constituye una vía patogénica de neurotoxicidad común<sup>31</sup>.

Aunque la patogenia de la ELA sigue siendo desconocida y muy heterogénea, recientes estudios han relacionado esta enfermedad con alteraciones en la autofagia y mecanismos de regulación del transporte vesicular del retículo endoplasmático<sup>32</sup>, como la disminución de la expresión de proteínas implicadas en las modificaciones postraduccionales de SOD1 (como Rab7, que condiciona su agregación)<sup>29</sup>.

La degeneración neuronal observada en esta patología conduce a una parálisis progresiva y a la muerte en 3-5 años<sup>29</sup>. Hasta la fecha, los tratamientos sintomáticos aprobados como Riluzol tienen poco efecto terapéutico<sup>33</sup>.

## 1.2. Terapia génica

La terapia génica se define como el proceso de modificación de la estructura o expresión del material genético para el tratamiento de enfermedades de base genética producidas por la mutación de uno o un pequeño número de genes<sup>3</sup>.

En la actualidad, los enfoques terapéuticos existentes se limitan al manejo temporal de los síntomas y tienen un limitado efecto terapéutico<sup>34</sup>. Con el desarrollo de la terapia génica, parece vislumbrarse un avance en este campo, con la aparición de tratamientos capaces de aumentar la supervivencia, e incluso, en algunos casos conseguir la curación del paciente<sup>18</sup>.

El desarrollo de terapias génicas modificadoras de la enfermedad se fundamenta en administrar sustancias toleradas por las células mediante vectores capaces de transferir genes u oligonucleóticos de manera efectiva, sin ejercer efectos tóxicos, mediante dosis únicas y a través de vías seguras y mínimamente invasivas<sup>35, 36</sup>. Para ello, en el tratamiento genético de las enfermedades se precisa conocer desde las vías metabólicas implicadas, hasta la evaluación de la biodisponibilidad de las moléculas administradas<sup>10, 26, 37</sup>, así como la vulnerabilidad de los circuitos neuronales<sup>5, 12, 13</sup>.

### 1.2.1. Niveles de intervención del tratamiento genético de las enfermedades

Las técnicas que se utilizan para la obtención de fármacos para el tratamiento genético de las enfermedades pueden modificar muchos escalones dentro de la homeostasis celular (Tabla 1), el ADN<sup>8, 27</sup>, ARN<sup>23</sup>, proteínas<sup>26</sup>, o disfunciones metabólicas<sup>10</sup>, farmacológicas<sup>17</sup> o nutricionales<sup>38</sup>.

Asimismo, dependiendo del procedimiento de aplicación, la terapia génica se divide en (1) *ex vivo*, terapia celular de células genéticamente modificadas e (2) *in vivo*, administrando directamente genes u oligonucleótidos mediante vectores plásmidos o virales<sup>39</sup>.

Las técnicas de edición *ex vivo* incluyen: células pluripotentes humanas (PSCs), células madre mesenquimales (MSCs) o células madre hematopoyéticas (HSCs)<sup>40</sup>.

Las técnicas de edición *in vivo* pueden actuar en distintos niveles según el procedimiento:

- Edición genómica mecanismo CRISPR-Cas9: técnica de modificación del ADN. La nucleasa Cas9 crea roturas selectivas de la cadena de ADN que condiciona la reparación homóloga o no del ADN, y CRISPR que sustituye una base por otra.
- Oligonucleótidos antisentido (ASOs): actúan a nivel del ARNm. Son oligonucleótidos complementarios a un gen diana para aumentar o bloquear su actividad.
- ARN mensajero de interferencia (iARNm): actúa a nivel del ARNm. Son un conjunto de ARN no codificantes que se dividen según la longitud de pares de bases que posean: *small*, *medium* y *long non-coding RNA*, y actúan facilitando la degradación o bloqueo de la traducción de un ARNm.

A su vez, la introducción del material genético se puede realizar mediante vectores virales y no virales:

- Los virales integran su material genético en el genoma celular. Los Lentivirus son virus ARN que poseen una retrotranscriptasa inversa, capacidades de transferencia eficaces pero son muy oncogénicos, limitando su uso a la inducción de mutaciones en modelos animales<sup>41</sup>. El desarrollo de los adenovirus (AAV) y las diferentes familias de cápsides ha desbancado al resto de vectores<sup>42</sup>. Son virus ADN de la familia *Parvoviridae*, poco oncogénicos e inmunogénicos<sup>1, 43</sup>. El AAV9, es el más utilizado en las ENDs debido a su capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica (BHE)<sup>25</sup> y el AAV5 parece ser el más efectivo en el transporte axonal neuronal<sup>25</sup>.
- Los no virales son nanopartículas formadas por plásmidos de ADN. No traspasan la BHE, por lo que deben administrarse intracranalmente<sup>38</sup>.

Tabla 1: Resumen de las técnicas utilizadas para el tratamiento genético de las enfermedades en función de su nivel de intervención, mecanismo que utiliza y un ejemplo de su aplicación. Fuente: elaboración propia.

Técnica		Nivel de intervención	Acción	Ejemplo
Trasplante de líneas celulares	*Células madre progenitoras inducidas (PSCi)	ADN	Sustitución de una línea celular	PSCi liberadoras de dopamina en EP (14)].
	*Células madre mesenquimales (MSCs)			MSCs liberadoras de GABA en EH [24].
	*Células madre hematopoyéticas (HSCs)			HSCs diferenciadas en microglía para EP [17], [41] y EA [4].
Técnicas de edición génica	*CRISPR-cas9	ADN	Rotura selectiva de cadena ADN y sustitución base simple	Activación de la tirosina hidroxilasa (TH) en EP [8].
ARN de interferencia		ARNm	Degradación o bloqueo de transcripción del ARNm	microRNA y siRNA/shRNA en EH [23], [25].
Oligonucleótido antisentido		ARNm	Bloquean la expresión proteica	Nusinersen para la AME [44] Tofersen para la ELA [45]
Mecanismo de transferencia	*VIRUS AAV Lentivirus *PLÁSMIDOS	ADN	Introducción o delección de un gen	AAV9 en AME [46]

### 1.2.2. Rutas y vías de administración

La elección de la vía de administración depende del alcance sistémico o local deseado. Las ventajas y desventajas de cada vía de administración se han discutido en muchas publicaciones<sup>17, 35, 47</sup> y se resumen en la Figura 1.

Por un lado, la liberación intracerebral directa es la preferida en casos de afectación localizada, como es el caso de la EP<sup>9, 38, 48</sup>, minimizando la afectación sistémica. Se utiliza para la administración de vectores que no traspasan la BHE o cuando se necesitan grandes concentraciones. No obstante, es un método muy invasivo de base.

Por otro lado, el tratamiento sistémico puede ser intravenoso, intraarterial o intratecal. La vía intravenosa es la vía menos invasiva, pero en su defecto, la menos efectiva en la incorporación de vectores al SNC, ya que éstos deben ser capaces de atravesar la BHE como el AAV9<sup>18</sup>. El inconveniente de la distribución sistémica es la presencia de reacciones inmunitarias y toxicidades a nivel orgánico<sup>21, 49, 50</sup>, además de la posibilidad de generación de anticuerpos anti-vector a largo plazo. Sin embargo, es la vía de elección para administrar el producto comercial Onasemnogene Apeparvovec. Es un vector basado en el AAV9 recombinante, sin capacidad de replicación, que contiene el ADNc del gen *SMN* humano<sup>46, 51</sup>. En la actualidad, la vía intraarterial ha sido sustituida por la intravenosa.

La vía intratecal consiste en administrar el tratamiento en el espacio subaracnoideo a lo largo del eje neuroaxial, y no requiere el traspaso de la BHE. Se ha utilizado para administrar Nusinersen en pacientes con AME<sup>44</sup>, para el tratamiento de la EH<sup>25</sup> y ELA<sup>27</sup>. La administración intracerebroventricular, que se ha utilizado en ensayos clínicos para la EP mediante AAV5<sup>23</sup> y AAV1<sup>52</sup>, y parece ser la que mejor proporción concentración/invasividad presenta, aunque puede causar neurotoxicidad<sup>35</sup>.

Como vías de administración en desarrollo, se encuentran la vía intranasal<sup>34</sup>, utilizada para la EA<sup>53</sup>, y la vía intraútero, en estudio para el tratamiento prenatal de la AME<sup>47</sup>.

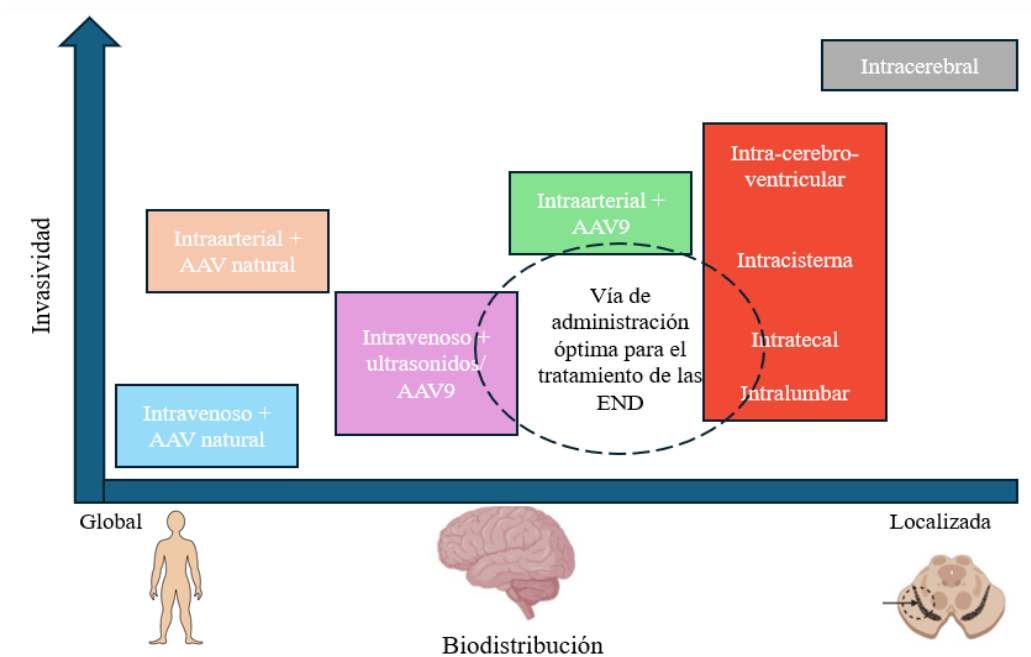


Figura 1. Vías de administración de las técnicas de terapia génica para END según biodistribución e invasividad. El círculo discontinuo corresponde con la vía ideal: segura, eficaz y mínimamente invasiva. Modificado de Fischell et al., 2021 [3].

### 1.2.3. Limitaciones de la transferencia de genes

Entre todas las enfermedades susceptibles de aplicar terapia génica, nos centramos en las ENDs. Éstas presentan un desafío adicional que no poseen otras enfermedades: la necesidad de traspasar la BHE<sup>1, 40, 54</sup>. Para ello, se han estudiado distintas vías de administración, obteniendo uno de los grandes descubrimientos en este campo, los vectores AAV9<sup>47, 55</sup>.

Se están investigando métodos físicos, como los ultrasonidos de alta frecuencia (FUS), que, junto la administración intravenosa de microburbujas produce “una alteración transitoria, local y reversible de la BHE permitiendo una ventana espacial por la que las moléculas cruzan al parénquima”<sup>34</sup>. Se han realizado estudios de biodisponibilidad, seguridad y efectividad en modelos de rata con Parkinson<sup>15, 56</sup>, y Alzheimer<sup>54</sup>, para la administración de factores neuroprotectores en primates<sup>55</sup>.

La segunda limitación que presenta la terapia génica es el mantenimiento de la actividad transcripcional de la manipulación génica. Las terapias basadas en AAV9 intravenoso se han demostrado duraderas, sin necesidad de dosis de recuerdo<sup>46</sup>. Sin embargo, las terapias basadas en oligonucleótidos tienen efecto limitado, por lo que la administración continuada supone una desventaja frente a otras técnicas<sup>44</sup>.



## **2. Justificación**

Las enfermedades neurodegenerativas disponen en la actualidad de terapias farmacológicas que tratan de paliar los síntomas y, al mismo tiempo, retrasar la progresión de la enfermedad. Los avances se están produciendo fundamentalmente en el campo de las terapias génicas, que parecen estar mostrando en ensayos clínicos verdaderos progresos en el modo de enfrentarse a la enfermedad. Sin embargo, parece que el desarrollo no es homogéneo y depende de diferentes factores que son importantes a la hora de ser estudiados.

Por este motivo, proponemos este estudio, que pretende ordenar en el momento actual los progresos alcanzados y los principales resultados obtenidos en el campo de las terapias génicas en las ENDs, así como las principales conclusiones y líneas de futuro que se pueden ir extrayendo de los resultados obtenidos.

## **3. Hipótesis y objetivos**

### **3.1. Hipótesis**

Tras el análisis teórico del campo de estudio, la revisión de la bibliografía pretende comprobar nuestras siguientes hipótesis.

- Los tratamientos basados en la modificación de la estructura y expresión del material genético ofrecerán, en general, un tratamiento curativo en las ENDs.
- El tratamiento será curativo, especialmente, en aquellas enfermedades monogénicas. y potencialmente curativo en las de herencia poligénica.
- Las diferentes técnicas de terapia génica disponibles se utilizarán dependiendo de la patogenia de la enfermedad.
- Las terapias génicas que utilizan vectores virales adenoasociados aumentarán significativamente la supervivencia.
- Las técnicas de terapia génica utilizadas en experimentación animal, que utilizan como vía de administración la vía intracerebral, serán difíciles de aplicar a la población humana.
- Los efectos adversos a largo plazo de la terapia génica provocarán problemas de seguridad y eficacia de la terapia.

## 3.2. Objetivos

El objetivo general del trabajo es analizar el estado actual de la aplicación de las técnicas de terapia génica a las ENDs.

Como objetivos específicos, nos planteamos:

- Primero: Realizar una revisión sistemática de la literatura más reciente sobre la terapia génica y su empleo en el tratamiento de enfermedades neurológicas.
- Segundo: Obtener una información actualizada sobre la aplicación de la terapia génica en algunas enfermedades como la EP, EA, AME, EH, ELA.
- Tercero: Estudiar la relación existente entre la eficacia de la terapia génica y la toxicidad de la misma.

## 4. Material y método

### 4.1. Material

Siguiendo las directrices PRISMA<sup>57</sup>, se realizó una revisión sistemática de la literatura (RSL) desde enero de 2020 hasta diciembre de 2023, con los términos y estrategias de búsqueda adaptadas a la base de datos Web of Science (WoS). Antes de dar comienzo a ésta, se establece como tema de investigación “terapia génica en enfermedades neurodegenerativas”.

Los términos que se utilizaron para realizar la búsqueda de las fuentes de información fueron:

- *neurodegenerative disease or neurodegenerative disorder*
- *alzheimer's disease*
- *amyotrophic lateral sclerosis (als)*
- *huntington's disease or huntingtons disease or huntingtons or huntingtons chorea*
- *parkinson's disease*
- *spinal muscular atrophy*
- *gene therapy*

## 4.2. Procedimiento

En toda investigación, es necesario utilizar datos actuales y evidencia sólida que respalde el tema que se quiere abordar, es por esto por lo que se realiza una RSL. Para que la búsqueda sea efectiva y arroje resultados fidedignos, se utiliza la estrategia PICoR (Figura 2).

Para unir cada concepto en la estrategia de búsqueda, empleamos los operadores booleanos OR (empleado para unir términos libres) y AND (unir cada concepto de búsqueda). La estrategia de búsqueda empleada en la base de datos es la siguiente: *Neurodegenerative Diseases OR Alzheimer's disease OR Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) OR Huntington's disease OR Parkinson's disease OR Spinal muscular atrophy) AND (gene therapy).*

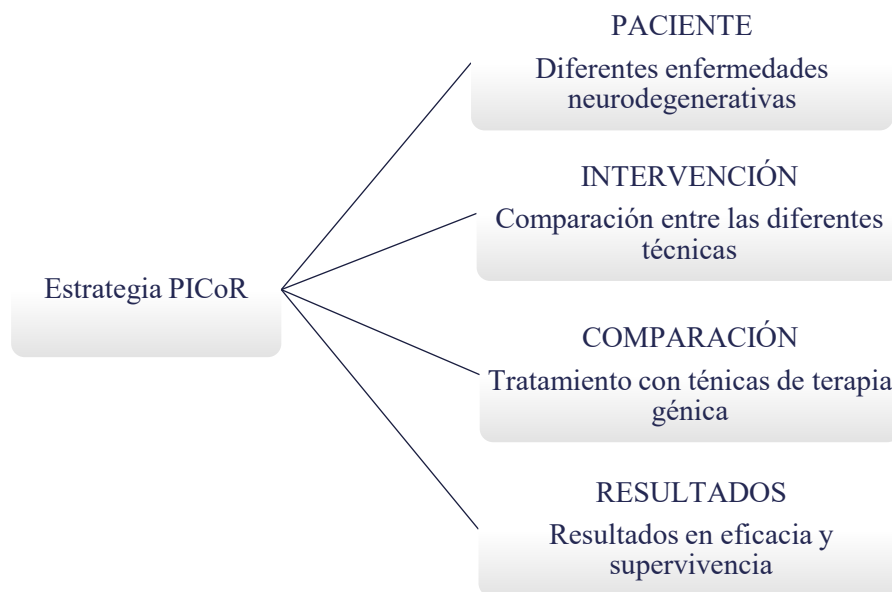


Figura 2. Estrategia PICoR, dividida en Paciente- Intervención- Comparación- Resultados. Fuente: elaboración propia.

Para llevar a cabo la selección de los artículos, en esta revisión se siguió el siguiente procedimiento:

- 1.- Tras obtener los artículos, se aplicaron una serie de filtros, como restringir el año de publicación desde enero de 2020 a diciembre de 2023; seleccionar revistas académicas; lenguaje español e inglés; disponibilidad de los artículos.
- 2.- Lectura de los títulos y resúmenes de los artículos.
- 3.- Lectura completa de los artículos seleccionados.
- 4.- Selección de los artículos que cumplieran los criterios de inclusión especificados (Tabla 2).

*Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión aplicados a la revisión bibliográfica sistemática (RLS). Fuente: elaboración propia.*

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículos que estudien la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas.</li> <li>• Artículos que estudien las diferentes técnicas de terapia génica, vías de administración y eficacia</li> <li>• Estudios descriptivos (reportes y series de casos), analíticos o experimentales.</li> <li>• Artículos que incluyeran información sobre las técnicas de terapia génica aplicadas en: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enfermedad de Alzheimer</li> <li>▪ Enfermedad de Parkinson</li> <li>▪ Atrofia muscular espinal</li> <li>▪ Esclerosis lateral amiotrófica</li> <li>▪ Enfermedad de Huntington</li> </ul> </li> <li>• Estudios experimentales “<i>in vitro</i>” de terapia génica</li> <li>• Estudios experimentales de terapia génica “<i>in vivo</i>” en humanos, primates no humanos y no primates.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudios que no incluyan los descriptores de búsqueda</li> <li>• Trabajos que no estudien las enfermedades descritas en los criterios de inclusión</li> <li>• Estudios de terapia génica en enfermedades distintas a las neurodegenerativas descritas.</li> </ul>

La búsqueda bibliográfica finalizó el 13 de diciembre de 2023, y los artículos seleccionados se almacenaron en el gestor bibliográfico Zotero <https://www.zotero.org/>.

### 4.3. Análisis de la información

Se desarrolló una síntesis cualitativa de los resultados, que permite la generación de una discusión, elaborando un diagrama de flujo con todos los pasos realizados en la revisión bibliográfica.

Se elaboraron tablas por enfermedades que recogieron autores, año de publicación, características de los estudios encontrados (metodología, país de origen y participantes).

Finalmente, se analizó la información recogida en las publicaciones, poniendo especial acento en la capacidad curativa de las terapias.

## 5. Resultados

En la primera revisión, se obtuvieron 1465 artículos, y tras aplicar la serie de filtros y criterios de inclusión y exclusión expuestos anteriormente, se obtuvieron un total de 59 artículos siguiendo el método PRISMA (Figura 3).

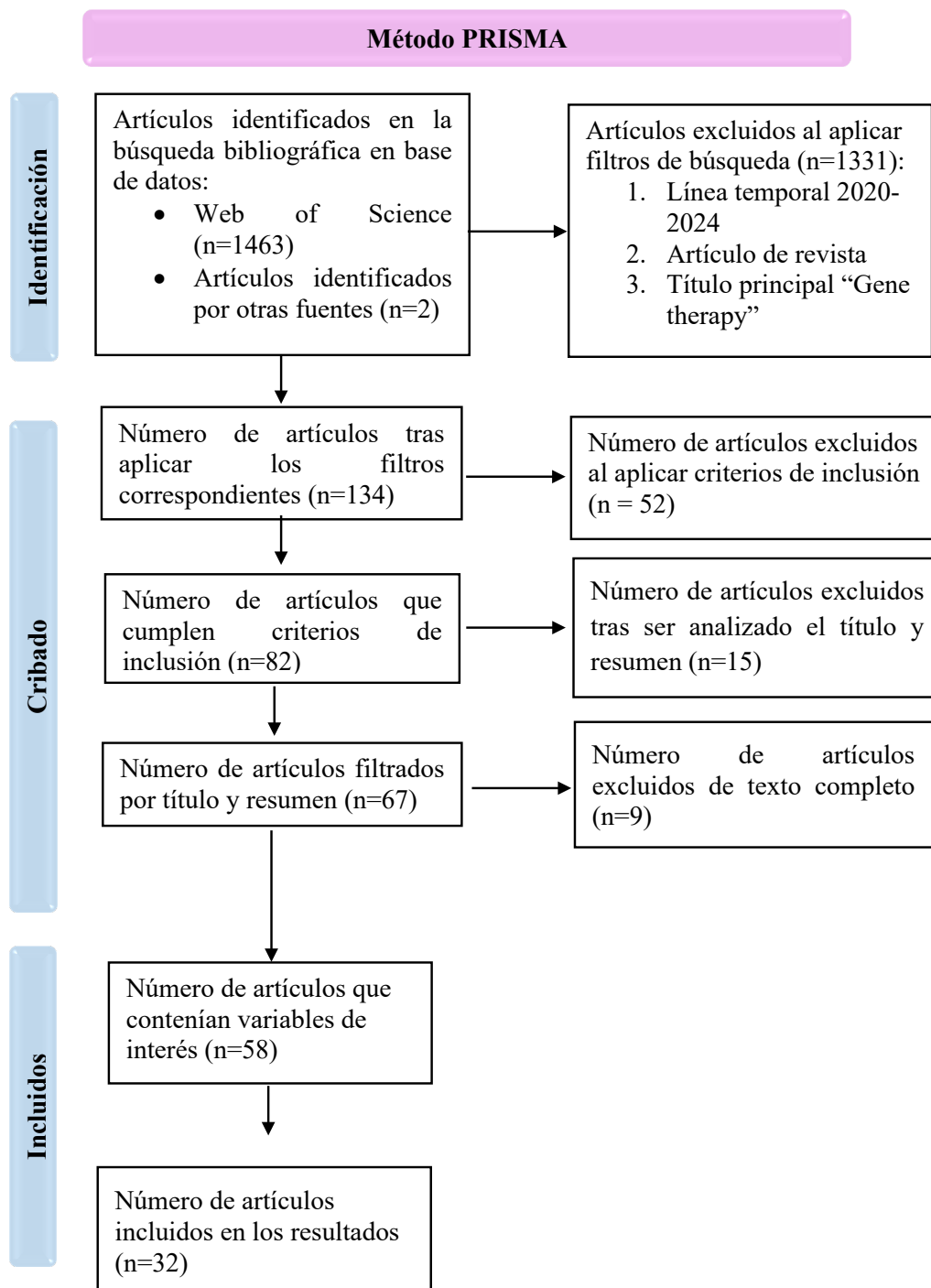


Figura 3. Diagrama de flujo de búsqueda. Fuente: elaboración propia.

Finalmente, se seleccionaron 32 artículos, entre los que se incluyeron ensayos clínicos (n=28) y estudios descriptivos (n=4), que tuvieron como objetivo el estudio de la eficacia de un tratamiento de terapia génica enfocado a una enfermedad neurodegenerativa concreta. Encontramos diferentes artículos sobre la Atrofia muscular espinal (n=8), Tabla 3, la enfermedad de Huntington (n=3), Tabla 4, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (n=6), Tabla 5, enfermedad de Parkinson (n=12), Tabla 6, y la enfermedad de Alzheimer (n=3) ,Tabla 7.

Tabla 3. Resultados: atrofia muscular espinal.

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Mendell Jerry et al., (2017) [46]  START;I; EE.UU.	Ensayo clínico y estudio descriptivo con cohorte histórica.	Pacientes con AME tipo 1 (n=15) <ul style="list-style-type: none"> <li>Grupo tratados con dosis baja (<math>6,7 \times 10^{13}</math>vg/kg) (n=3)</li> <li>Grupo tratados con alta dosis (<math>2,0 \times 10^{14}</math>vg/kg) (N=12)</li> </ul> Seguimiento 24 meses.	Onasemnogene abeparvovec iv (AAV9-SMN)	<b>Significativo.</b>  Superioridad en alcance de hitos de desarrollo motor y supervivencia del tratamiento en comparación con cohorte histórica. Superioridad del grupo de alta dosis.
Besse et al., (2020) [36]  Francia	Ensayo clínico	Ratones trasgénicos divididos en grupos: <ul style="list-style-type: none"> <li>Control (n=22)</li> <li>Administración iv (n=22)</li> <li>Administración icv (n=32)</li> </ul>	Administración AAV9-SMN iv o icv	<b>Significativas</b> diferencias con el grupo control.  <b>No significativas</b> diferencias entre iv-icv en la expresión de SMN.  <b>Significativo</b> aumento de supervivencia en grupo icv.
Chand et al., (2022). [49]  EE. UU.	Serie de casos	Pacientes con AME tipo 1 con dos copias de SMN2 tratados con Onasemnogene abeparvovec: <ul style="list-style-type: none"> <li>Peso &lt;8,5 kg (n=97)</li> <li>Peso &lt;13,5 kg (n=5)</li> </ul>	Onasemnogene abeparvovec iv (AAV9-SMN)	<b>No diferencias significativas.</b>  Se determinan resultados similares de seguridad y presencia de eventos adversos en ambos grupos.
Pane et al., (2022). [44]  Italia	Serie de casos y estudio descriptivo con cohorte histórica	Pacientes diagnosticados de AME tipo 1 tratados con nusinersen <ul style="list-style-type: none"> <li>AME tipo 2 (n=46)</li> <li>AME tipo 3 (n=65)</li> </ul> Duración 2,56 años.	Nusinersen intratecal: ASO activador del mRNA SMN2	<b>Significativo.</b>  Mejoría en las pruebas de función motora en ambos grupos a partir de los 12 meses de estudio en comparación con cohorte histórica.



Continuación tabla 3. Resultados: atrofia muscular espinal.

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Rich et al., (2022). [47] EE. UU.	Ensayo clínico	Cerdas embarazadas de 4-5 lechones (n=5): <ul style="list-style-type: none"> <li>Grupo tratamiento (n=4)</li> <li>Grupo control (n=1)</li> </ul>	Administración iv shRNA-AAV9	<b>No significativo.</b> No es un modelo viable para el estudio intraútero de terapia génica.
Strauss et al., (2022). SPR1NT; III; [51] EE.UU.	Ensayo clínico y estudio descriptivo con cohorte histórica	Pacientes <6 sem de vida presintomáticos con AME tipo 1 o 2, con dos o tres copias de SMN2, (n=14). Seguimiento 18 meses.	Onasemnogene abeparvovec iv (AAV9-SMN)	<b>Significativo.</b> La administración temprana mejora la evolución de la enfermedad.
Pane et al., (2023) [58] Italia	Serie de casos	Pacientes AME tipo 1 tratados con Onasemnogene abeparvovec (n=67) con aumento de rango de estudio (>6 meses, >8,5 kg) Seguimiento 12 meses	Onasemnogene abeparvovec iv (AAV9-SMN)	<b>Significativo.</b> Los pacientes asintomáticos de menor edad y menor peso tienen mejores resultados.
Stettner et al., (2023). [21] Suiza	Reporte de casos	Pacientes con AME tratados con Onasemnogene abeparvovec en Suiza entre junio de 2020 hasta diciembre 2021 (n=9). <ul style="list-style-type: none"> <li>AME tipo 1 (n=6)</li> <li>AME tipo 2 (n=1)</li> <li>Presintomáticos (n=2)</li> </ul> Duración 2 años	Onasemnogene abeparvovec iv (AAV9-SMN)	<b>Significativo.</b> Análisis de las complicaciones de la terapia con Onasemnogene Abeparvovec.
<b>Abreviaturas:</b> AAV9: vector adenovirus asociado 9; AME: atrofia muscular espinal; ASO: oligonucleótido antisentido; ICV: intracerebroventricular; IV: intravenoso; sem: semana; shRNA: ARN de horquilla corta; SMN: proteína de supervivencia de neuronas motoras.				

Tabla 4. Resultados: enfermedad de Huntington

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Kotowska-Zimmer et al., (2022). [23]  Polonia	Ensayo clínico	Ratones de 16-18 semanas de edad: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo control (n=9)</li> <li>• Grupo miRNA (n=10)</li> <li>• Grupo shRNA (n=10)</li> </ul>	Administración intraestriatal AAV5-miRNA y AAV5-shRNA	<b>Significativo</b> en ambos en reducción de mHTT comparación con control.  <b>No significativo</b> en los resultados de supervivencia con shRNA.
Wencesalau et al., (2022) [24]  Brasil	Ensayo clínico	Ratas macho (n=60) de 8 semanas de vida	Administración hIDPSC intraperitoneal	<b>Significativo.</b>  Se restauran los niveles de BDNF con una dosis baja de células.
Ferlazzo et al., (2023) [26]  Italia	Ensayo clínico	Ratones (n=44) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Control</li> <li>• Con expansión de tripletes CAG</li> </ul> <i>In vitro</i> células neuronales humanas EH	Administración iv AAV9-MTF1	<b>Significativo</b> en ambos grupos en comparación con control.  Se revierte parcialmente los efectos de mHTT.  <b>No significativo</b> para revertir el estrés oxidativo.
<p><b>Abreviaturas:</b> AAV5 vector adenovirus asociado 5, BDNF factor neurotrófico derivado del cerebro, EH enfermedad de Huntington, hIDPSC células madre derivadas de la pulpa dental inmadura humana, HTT proteína huntingtina, IV intravenosa, iPSC células madre pluripotentes inducidas, MTF1 factor de transcripción sensible al metal, miHTT microARN dirigido a HTT, miRNA microARN, shRNA ARN de horquilla corta.</p>				

Tabla 5. Resultados: esclerosis lateral amiotrófica

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Lim et al., (2020). [27] EE. UU.	Ensayo clínico	Ratones macho transgénicos hSOD1 (n=14)	Administración intratecal AAV9-CRISPR-Cas9	<b>Significativo</b> en la fase final de la enfermedad. Retraso de evolución de la enfermedad. <b>No significativo</b> en fases tempranas.
Miller (2020) [45] EEUU	Ensayo clínico fase 1-2	Pacientes adultos (n=50), un grupo placebo y cuatro en tratamiento a diferentes dosis	Administración intratecal de Tofersen	<b>Significativo.</b> Reducción de SOD1 en LCR. No significativo en parámetros clínicos.
Nizzardo et al., (2020) [32] Italia	Ensayo clínico	Ratones macho y hembras transgénicas (n=9)	Administración intramuscular AAV9-SYT13	<b>Significativo.</b> La sobreexpresión en motoneuronas de SYT13 aumenta su supervivencia neuronal.
Rodríguez-Sánchez (2022) [28] España	Ensayo clínico	Ratones (n=23) <ul style="list-style-type: none"> <li>Control (n=13)</li> <li>Transgénico TDP-43 (n=10)</li> </ul>	Administración de O <sub>3</sub>	<b>No significativo.</b> No se ha demostrado que retrase la progresión de la enfermedad.
S. Wang et al., (2022) [33] EE. UU.	Ensayo clínico	Ratones (n=6) divididos: control y tres transgénicos (SOD1)	Administración intratecal AAV1-CAV-1	<b>Significativo.</b> Relativo en el aumento de la supervivencia (10%). Gran significación en el retraso de la enfermedad.
Tejwani et al., (2023) [30] EE. UU.	Ensayo clínico	Ratones divididos en cuatro grupos: mutados y no mutados, tratados y no tratados.	Administración intratecal ASO-Nlk	<b>Significativo.</b> Reduce las inclusiones TDP-43 y se elimina la toxicidad generada.
<p><b>Abreviaturas:</b> ASO nucleótidos antisentido, CAV1 caveolina-1, Nlk quinasa tipo nemo, SOD1 superóxido dismutasa 1, SYT13 sinaptotagmina 13, UCB-MCs células mononucleares derivadas del cordón umbilical, VEGF factor de crecimiento del endotelio vascular.</p>				

Tabla 6. Resultados: enfermedad de Parkinson

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Chen et al., (2020) [41]  EEUU	Ensayo clínico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ratones hembra (n=3) 10 semanas</li> <li>• Ratones macho (n=4) inducidos neurodegeneración MPTP</li> </ul>	Trasplante HSC- GDNF iv	<b>Significativo.</b>  Mejoría de la sintomatología motora y no motora y restauración de los niveles de dopamina en SNpc.
Grupta et al., (2020) [59]  EE. UU.	Ensayo clínico	<p>Ratones macho TH+ (n=19) de 6-12 semanas de edad distribuidos en cuatro grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Control</li> <li>• Dos grupos inyectados con C3 o fluorescente</li> <li>• Grupo 6-OHDA</li> </ul>	Administración de AAV2-C3 transferasa	<b>No significativo.</b>  No se encontraron diferencias significativas entre grupos estudiados, pero si con control.
F.Wang et al., (2020) [56]  China	Ensayo clínico	Ratas 6-OHDA asignadas en cuatro grupos: control y tres grupos tratados con ultrasonidos, uno de ellos con un retrovirus-GDNF	Administración de retrovirus-GDNF intraperitoneal + microburbujas combinadas con US	<b>Significativo.</b>  Aumento de concentración de dopamina en el grupo tratado y mejoría de síntomas motores.
Cui et al. (2021) [37]  EE. UU.	Ensayo clínico	<p>Ratones (n=11) divididos en dos grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 12 meses de vida (n=6)</li> <li>• 18 meses de vida (n=5)</li> </ul>	Administración intracerebral de lentivirus-mRNA- factores de transcripción Phox2a/2b, Hand2, Gata3.	<b>Significativo.</b>  Mejoría de la sintomatología motora y memoria espacial al aumentar la concentración de noradrenalina.

Continuación tabla 6. Resultados: enfermedad de Parkinson

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
Renko et al. (2021) [7] Finlandia	Ensayo clínico	Ratas macho: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo control sano (n=4)</li> <li>• Grupo control 6-OHDA (n1=11, n2=1, n3=9)</li> <li>• Grupo 6-OHDA y tratamiento a distintas concentraciones (n1=10, n2=10)</li> </ul>	Administración de BT44 subcutáneo	<b>Significativo.</b> Mejoría de la clínica en comparación con el grupo control.  <b>No significativo</b> en comparación con estudios GDNF intracerebral.
Soner et al., (2021) [9] Turquía	Ensayo clínico	Ratas 6-OHDA (n=13): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Control (n=6)</li> <li>• Dos grupos en tratamiento a distintas concentraciones (n1=9, n2=8)</li> </ul>	Administración de CAPE intracerebral	<b>Significativo.</b> Prevención de muerte neuronas TH+ en ratas con neurodegeneración inducida.
Fernández-Parrilla et al., (2022) [38] México	Ensayo clínico	Ratas macho de 2 meses de edad (n=120): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Control (n=20)</li> <li>• Grupos 6-OHDA (n=40)</li> <li>• Grupo tratamiento (n=60)</li> </ul>	Utilización de un plásmido de ADN- hCNDF intracraneal	<b>Significativo,</b> Se demuestra el restablecimiento de los circuitos nigroestriados.
Kip et al., (2022) [6] EE. UU.	Ensayo clínico	Ratas macho con inducción de neurodegeneración mediante 6-OHDA (n=9)	Estimulación cerebral profunda (ECP): administración intracerebral AAV5-opsinas a distintas longitudes de onda.	<b>Significativo.</b> Mejoría de la sintomatología motora de la EP.

Continuación tabla 6. Resultados: enfermedad de Parkinson.

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultado
J. Li et al., (2022) [17] China	Ensayo clínico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primates no humanos monos (n=12)</li> <li>• Ratones hembra (n=8)</li> <li>• Ratas macho (n=19)</li> </ul>	Administración intraputamina, intraarterial e intraventricular de MSCs-DOPA	<b>Significativo</b> en administración intraestriatal.  El tratamiento corrige el déficit de dopamina y mejora el déficit motor en administración intraestriatal. Poco significativo intraarterial e intraventricular.
Y. Wang et al., (2022) [15] China	Ensayo clínico	Ratas macho (n=48) con EP inducido MPTP divididos en 5 grupos	Administración de gastrodina + microburbujas combinadas con US.	<b>Significativo.</b> Mejoría de la distribución de neuronas TH+ demostrado por IHQ.
Azevedo et al., (2023) [48] Países Bajos	Ensayo clínico	Ratas (n=184) divididas en grupos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Control (n1=20, n2=44)</li> <li>• Baja dosis (n=32)</li> <li>• Alta dosis (n=88)</li> </ul>	Administración intraputamina de AAV5-GDNF	<b>Significativo.</b> Mejoría de la sintomatología en ambos grupos pero solo en el de baja dosis aumento de neuronas dopaminérgicas.
Narváez et al., (2023) [8] EE. UU.	Ensayo clínico	Ratones macho con Parkinson inducido mediante 6-OHDA (n=4)	Utilización de CRISP/Cas9-lentivirus intraestriatal	<b>Significativo.</b> Aumento de la producción de dopamina por los astrocitos del cuerpo estriado.
<p><b>Abreviatura:</b> 6-OHDA 6-hidroxidopamina, AAV2 vector adenovirus asociado 2, BHE barrera hematoencefálica, CAPE éster fenético del ácido cafeico, ECP estimulación cerebral profunda, EP enfermedad de Parkinson, GDNF factor neurotrófico derivado de la glía, hCNDF factor neurotrófico dopaminérgico humano cerebral, HSC células madre hematopoyéticas, IHQ inmunohistoquímica, iv intravenoso, MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MSCs células madre mesenquimales, SNpc sustancia negra pars compacta, TH+ tirosina hidroxilasa positivos, US ultrasonidos.</p>				

Tabla 7. Resultados: enfermedad de Alzheimer

Referencia completa, año y país	Tipo de diseño	Tamaño muestral	Terapia génica utilizada	Resultados
Jeon et al., (2020) [52] Corea del Sur	Ensayo clínico	Ratas hembra de 8 semanas	Administración AAV1-Rheb (S19) intrahipocampal.	<b>Significativo.</b> Aumento de expresión en neuronas hipocampales, pero no en astrocitos.
Capsoni and Cattaneo et al. (2022) [53] Italia	Ensayo clínico	Ratones Ts65Dn de 4 meses con acúmulo de APP (n=6)	Administración intranasal de hNGFp.	<b>Significativo.</b> Restaura la morfología de la microglía y restablece morfología de astrocitos.
Mishra et al., (2023) [4] EE.UU.	Ensayo clínico	Ratones trasgénicos 5xFAD de dos meses de edad (n=46)	Trasplante de células HSPCs <i>iv</i> .	<b>Significativo.</b> Mejoría de la función cognitiva y de la concentración celular de microglía, pero no disminución de placas beta-amiloide.
<b>Abreviaturas:</b> 5xFAD 5 mutaciones familiares autosómico dominantes, AAV1 virus adenoasociado, APP proteína precursora amiloide, BDNF factor neurotrófico derivado del cerebro, hNGFp factor de crecimiento nervioso humano, HSPCs células madre hematopoyéticas y células progenitoras.				

Tras el análisis de la información obtenida de los artículos, se propone la clasificación de los resultados según la (Figura 4), y se procede al análisis de los resultados.

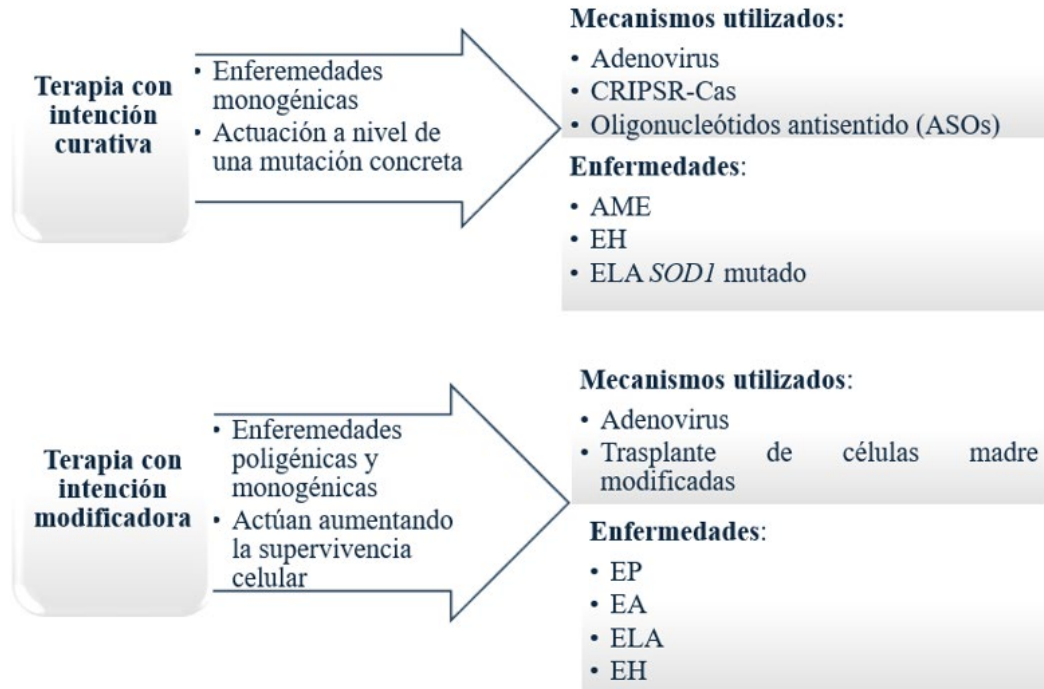


Figura 4. Análisis de los resultados. Las terapias con intención curativa consisten en la introducción de un gen o de un oligonucleótido mediante vectores adenoasociados o técnicas de edición génica para enfermedades con una mutación actuable. Sin embargo, las terapias con intención modificadora utilizan los adenovirus o el trasplante de células madre para la introducción de factores que actúen aumentando la supervivencia celular, tanto en enfermedades monogénicas como poligénicas. Fuente: elaboración propia.

## 5.1. Terapias con intención curativa

En el caso de la AME, se aprobó el Onasemnogene Apeparvovec (Zolgensma<sup>®</sup>), un medicamento de terapia génica que utiliza un vector viral, el cual incorpora el gen de la proteína SMN que sufre mutación en la enfermedad<sup>19</sup>. Ha demostrado ser eficaz en términos clínicos mediante escalas como CHOP INTEND en ensayos clínicos en humanos comparado con cohortes históricas<sup>46, 49, 51, 58</sup>. Se ha determinado que la efectividad del tratamiento depende de (1) la dosis administrada, mediante el ensayo



START:I<sup>46</sup> siendo más efectivo cuanto mayor es la dosis, y (2) la edad y peso en el momento de administración, aumentándose el rango de peso en los estudios de Chand et al., 2022<sup>49</sup>, y siendo explícitamente analizado en el trabajo de Pane et al., 2023<sup>58</sup> y colaboradores<sup>19, 21</sup>, con los datos obtenidos del ensayo SPR1NT;III;<sup>51</sup>, donde constata que los pacientes asintomáticos de menor peso tienen resultados motores y de supervivencia más beneficiosos. Por ello, se ha establecido un protocolo de tratamiento en pacientes asintomáticos con diagnóstico prenatal<sup>21</sup>, y se ha investigado la administración intraútero de la terapia en modelos animales, resultando no viables de momento<sup>47</sup>.

Años más tarde, se aprobó Nusinersen (Spinraza®), con resultados significativos en la adquisición de hitos motores<sup>44</sup>. Sin embargo, para el tratamiento de la AME se prioriza Onasemnogene Apeparvovec frente Nusinersen ya que, mientras que éste se administra en única dosis y de manera intravenosa, Nusinersen se administra intratecal mediante dosis repetidas<sup>19, 35</sup>.

Otra terapia basada en oligonucleótidos es Tofersen (Qalsody®) intratecal, diseñado para el tratamiento de la ELA con *SOD1* mutada. Se observó que sí disminuía la concentración de la proteína en el LCR, pero no ha demostrado tener impacto en la progresión clínica<sup>45</sup>.

Los trabajos de edición génica frente a *SOD1* también han obtenido resultados modestos, aunque estos sí aumentaron un 40% la supervivencia y mejoraron la atrofia muscular en comparación con los controles, por lo que podría ser una línea de tratamiento a seguir<sup>27</sup>.

Por último, en el Huntington, la administración de Tominersen (ROCHE) no han obtenido resultados concluyentes debido a la heterogeneidad alélica que presenta el gen mutado, por lo que los trabajos se enfocan en dilucidar la patogenia<sup>25</sup> y bloquear la transcripción del ARNm mediante ARN no codificantes (shRNA y miRNA), que bloquean específicamente la traducción del gen *HTT* con resultados exitosos, pero sin significación en parámetros clínicos<sup>23</sup>.

## 5.2. Terapias con intención modificadora

La terapia modificadora de la enfermedad está basada en la administración de factores neurotróficos o sustancias neuroprotectoras mediante vectores o células madre, en aquellas enfermedades que carecen de una diana genómica específica, o en aquellas que existe, pero no se ha mostrado suficientemente útil.

- En la enfermedad de Huntington, los resultados con AAV9 no han sido significativos<sup>26</sup>, aunque sí lo han sido los tratamientos mediante células madre<sup>24</sup>. Deducimos que una dosis mínima de células es suficiente para conferir neuroprotección, ya que se obtuvieron mejores resultados en el grupo de menor dosis. Este fenómeno también se observa en modelos vectoriales de Parkinson<sup>48</sup>.
- Se determina que el Parkinson<sup>8</sup> y el Alzheimer<sup>52</sup> tienen una diana terapéutica común, consistente en el sistema de neuroprotección mediada por astrocitos y restablecimiento de microglía. En la EP, la administración vectorial intracerebral es la más estudiada en modelos animales y con mejores resultados clínica y bioquímicamente<sup>8, 9, 37, 38, 48</sup>. Los estudios con células madre sintetizadoras de DOPA y restauradoras de microglía son significativos, pero no tan unánimes, ya que algunos estudios determinan la superioridad de la vía intracerebral frente a la sistémica<sup>17</sup>, mientras que otros han obtenido resultados esperanzadores por vía intravenosa<sup>41</sup>. Los resultados en la EA han sido menos prometedores, ya que, aunque aumentaron la supervivencia celular, o no restauraron la microglía<sup>52</sup> o no disminuyeron los agregados  $\beta$ -amiloideos<sup>4</sup>.
- Se ha descubierto un sistema de neuroprotección actuable en la ELA basado en la regulación homeostática de la autofagia y tráfico vesicular, bien sea aumentando la actividad lisosomal<sup>30</sup> o administrando proteínas relacionadas con el transporte, como sinaptotagmina 13<sup>32</sup>, aunque de momento los estudios con moléculas neuroprotectoras han conseguido mejores resultados de supervivencia<sup>33</sup>.

## 6. Discusión

En el presente trabajo de revisión de los últimos tres años y medio, se ha abordado el panorama actual de los tratamientos basados en terapia génica de cinco tipos de ENDS, incluyendo aquellos tratamientos que se encuentran ya aprobados para el tratamiento de algunas de ellas, así como los enfoques terapéuticos potenciales para aquellas aún sin tratamiento.

Las enfermedades, según la visión de la terapia génica, pueden dividirse en aquéllas que poseen una mutación accionable y aquéllas en las que la herencia es poligénica, y, por lo tanto, en principio no tienen diana actuable. En aquellas enfermedades con mutación accionable, en las que las células portadoras de mutaciones conductoras muestran sensibilidad como respuesta a una terapia dirigida, se eligen las técnicas de edición génica o de terapia génica de introducción o eliminación de un gen u oligonucleótido. Sin embargo, en estas enfermedades, la experimentación *in vivo* con modelos de animales es difícil de extrapolar a modelos humanos, y la experimentación nunca podrá ser fidedigna, ya que solo el paciente posee la carga mutacional y patogénica completa, como es el caso de *SOD1*, que presenta mutaciones en más de 100 alelos<sup>23</sup>.

Por otro lado, si no tenemos mutaciones accionables o las tenemos, pero la heterogeneidad alélica es tan grande que no se ha desarrollado ninguna técnica específica para la mutación del paciente, las terapias modificadoras de la enfermedad consisten en administrar factores que aumenten la supervivencia celular, disminuyan la toxicidad derivada de las inclusiones o de los radicales libres. En esa misma línea, podemos determinar que algunas ENDS tienen vías patogénicas y, por ende, objetivos terapéuticos comunes, como, por ejemplo, Alzheimer y Parkinson, con la disfunción de la microglía o el Huntington, la ELA y la AME, donde se establece que los defectos del transporte lisosomal y mecanismos de autofagia celulares intervienen en la agregación e inclusión proteica y, por lo tanto, en la toxicidad celular característica de estas enfermedades<sup>30</sup>.

Las enfermedades que se encuentran más avanzadas en los estudios preclínicos de los tratamientos de manipulación génica son aquellas que cuentan con una literatura más extensa sobre el estudio de la biodistribución de los fármacos, como es el caso del

Parkinson<sup>17</sup>, y estudios de seguridad y farmacovigilancia, como en la atrofia medular espinal<sup>21, 35, 36, 49</sup>.

En primer lugar, las vías de administración más eficaces parecen ser aquellas que permiten una transferencia directa, es decir, las intracerebrales<sup>36</sup>. Sin embargo, las ENDS no tienen un proceso patológico local, sino que su afectación tiende a extenderse por todo el SNC. Por ejemplo, en el caso del Parkinson, se ha investigado la administración subcutánea de factores neuroprotectores, con resultados significativos en modelos de rata, pero no en humanos, demostrando su inferioridad frente a la vía intracerebral<sup>7</sup>. A pesar de ello, se están explorando terapias con resultados más prometedores, como la administración intranasal de neurotrofina en Alzheimer<sup>53</sup> o la apertura de BHE mediante microburbujas y ultrasonidos en Parkinson. Esta última terapia, ha demostrado ser exitosa en la administración intravenosa de GDNF<sup>56</sup> y gastrodina<sup>15</sup>, consiguiendo aumentar la síntesis de dopamina por parte de los astrocitos.

En segundo lugar, el proceso de transferencia cuenta con eventos adversos derivados de la técnica utilizada. Por un lado, las vías intravenosa e intratecal producen toxicidad sistémica, no solo porque los vectores virales más frecuentemente usados son hepatotropos y provocan hepatotoxicidad, sino porque además, las dosis administradas son mayores e, incluso, insuficientes con una única administración. Este es el caso de Nusinersen intratecal para el tratamiento de la AME, que requiere un mínimo de 5 dosis para que se vea modificada la supervivencia neuronal en un 10%<sup>44</sup>. De nuevo, los resultados significativos obtenidos en monos administrando una dosis son difícilmente extrapolables a humanos ya que el volumen inyectado es inviable en nuestra especie<sup>35</sup>. Por otra parte, aunque la seguridad de la vía intratecal se ha demostrado en algunos estudios<sup>29</sup>, en otros se ha puesto en duda confirmando que la administración intratecal empeora la progresión de las enfermedades como la ELA en ratas<sup>33</sup>, constituyendo un factor de confusión en la significación de los estudios<sup>33</sup>.

En último lugar, es igual de importante tratar un paciente como el que sea capaz de superar los efectos adversos derivados de la terapia. Los estudios de farmacovigilancia de las terapias génicas de la AME son los más avanzados, donde se reflejan los efectos adversos con un alto ratio riesgo-beneficio debido a la mejoría en la función motora y respiratoria, pero determinando la importancia de los efectos a corto<sup>21</sup> y largo plazo por la incidencia de tumores<sup>20</sup> y anomalías esqueléticas<sup>50</sup>.

En cuanto a las limitaciones del estudio, en el trabajo se ha intentado abordar la influencia de las terapias génicas sobre las ENDs más importantes buscando los factores comunes de eficacia y seguridad, siendo imposible profundizar más en algunas terapias en las que hubiera sido interesante abordar el motivo por el cual la terapia génica empleada no ha obtenido eficacia significativa. No se han abordado las diferencias de género que sí son factores importantes en las ENDs. Tampoco hemos podido abordar los orígenes o la importancia del tiempo de administración en las diferentes terapias, aspecto que es fundamental en el tratamiento de las ENDs.

## 7. Conclusiones

- **Primera.** La terapia génica en ENDs ofrece esperanza para el desarrollo de intervenciones efectivas que consigue, en algunos casos, ralentizar la progresión de la enfermedad, y en otros, curar potencialmente a los pacientes.
- **Segunda.** Las terapias con intención curativa están dirigidas a nivel de una mutación específica, mientras que las terapias modificadoras actúan aumentando la supervivencia celular mediante la administración de factores neurotróficos o moléculas neuroprotectoras.
- **Tercera.** Las terapias con intención curativa que han mostrado resultados prometedores en términos de significación clínica incluyen la introducción de un gen u oligonucleótido en el caso de la AME y en técnicas de edición génica en el caso de la ELA. No se han obtenido resultados clínicos significativos para la EH.
- **Cuarta.** Las terapias con intención modificadora han demostrado resultados clínicos significativos en la EP, utilizando tanto células madre como la administración vectorial de un factor neurotrófico. En EH, se han observado avances mediante terapias con células madre, mientras que en la ELA se han logrado progresos a través de la introducción de factores mediante vectores u oligonucleótidos. No obstante, en la EA, los resultados obtenidos hasta el momento son más limitados.
- **Quinta.** Algunas ENDs comparten vías patogénicas comunes que pueden constituir objetivos viables para la terapia génica. Este es el caso de Parkinson y Alzheimer, por un lado, y de Huntington, ELA y AME por otro.
- **Sexta.** Según las características descritas para la obtención de una vía de administración ideal, se determinan las siguientes rutas como las más adecuadas: intraarterial, intravenosa con ultrasonidos e intratecal.
- **Séptima.** Se requiere una investigación continua y colaborativa para superar los desafíos científicos, éticos y clínicos asociados a estas intervenciones, con el fin de extrapolarlas del laboratorio a la práctica clínica. Los efectos adversos constituyen un problema que debe ser abordado en este tipo de terapias.
- **Octava.** Deben continuar los esfuerzos para definir mejor (1) la historia natural y los resultados clínicos más relevantes de muchos trastornos

neurodegenerativos y (2) los mecanismos implicados en el propio proceso neurodegenerativo.

## 8. Referencias bibliográficas

1. McMillan HJ, Proud CM, Farrar MA, Alexander IE, Muntoni F, Servais L. Onasemnogene abeparvovec for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2022;22(9):1075-90.
2. Pauwels EKJ, Boer GJ. Parkinson's Disease; a Tale of Many Players. *Med Princ Pract.* 2023;32(3):155-65.
3. Fischell JM, Fishman PS. A Multifaceted Approach to Optimizing AAV Delivery to the Brain for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci.* 2021;15:747726.
4. Mishra P, Silva A, Sharma J, Nguyen J, Pizzo DP, Hinz D, et al. Rescue of Alzheimer's disease phenotype in a mouse model by transplantation of wild-type hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell rep.* 2023;42(8):112956.
5. Zeng L, Jiang HL, Ashraf GM, Li ZR, Liu R. MicroRNA and mRNA profiling of cerebral cortex in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by RNA sequencing. *Neural Regen Res.* 2021;16(10):2099-+.
6. Kip E, Bentall L, Underwood CF, Hughes SM, Parr-Brownlie LC. Patterned Stimulation of the Chrimson Opsin in Glutamatergic Motor Thalamus Neurons Improves Forelimb Akinesia in Parkinsonian Rats. *Neuroscience* de 2022;507:64-78.
7. Renko JM, Mahato AK, Visnapuu T, Valkonen K, Karelson M, Voutilainen MH, et al. Neuroprotective Potential of a Small Molecule RET Agonist in Cultured Dopamine Neurons and Hemiparkinsonian Rats. *J Park Dis.* 2021;11(3):1023-46.
8. Narvaez-Perez LF, Paz-Bermudez F, Avalos-Fuentes JA, Campos-Romo A, Floran-Garduno B, Segovia J. CRISPR/sgRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) as a therapeutic tool for Parkinson's disease. *Gene ther.* 2023.
9. Soner BC, Acikgoz E, Inan SY, Ayla S, Sahin AS, Oktem G. Neuroprotective Effect of Intrastratial Caffeic Acid Phenethyl Ester Treatment in 6-OH Dopamine Model of Parkinson's Disease in Rats. *Park Dis.* 2021;2021:5553480.
10. Feher M, Marton Z, Szabo A, Kocsa J, Kormos V, Hunyady A, et al. Downregulation of PACAP and the PAC1 Receptor in the Basal Ganglia, Substantia



Nigra and Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus in the Rotenone model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11843.

11. Song J, Liu L, Li Z, Mao T, Zhang J, Zhou L, et al. Lycium barbarum polysaccharide improves dopamine metabolism and symptoms in an MPTP-induced model of Parkinson's disease. *BMC Med.* 2022;20(1):412.

12. Challis C, Hori A, Sampson TR, Yoo BB, Challis RC, Hamilton AM, et al. Gut-seeded  $\alpha$ -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci.* 2020;23(3):327-+.

13. Lee JH, Han JH, Joe EH, Jou I. Small heterodimer partner (SHP) aggravates ER stress in Parkinson's disease-linked LRRK2 mutant astrocyte by regulating XBP1 SUMOylation. *J Biomed Sci.* 2021;28(1):51.

14. Kumar M, Srikanth MP, Deleidi M, Hallett PJ, Isacson O, Feldman RA. Acid ceramidase involved in pathogenic cascade leading to accumulation of  $\alpha$ -synuclein in iPSC model of GBA1-associated Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2023;32(11):1888-900.

15. Wang Y, Luo K, Li J, Liao Y, Liao C, Chen WS, et al. Focused Ultrasound Promotes the Delivery of Gastrodin and Enhances the Protective Effect on Dopaminergic Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:884788.

16. Kang X, Ploner A, Pedersen NL, Bandres-Ciga S, Noyce AJ, Wirdefeldt K, et al. Tumor Necrosis Factor Inhibition and Parkinson Disease A Mendelian Randomization Study. *Neurology.* 2021;96(12):E1672-9.

17. Li J, Li N, Wei J, Feng C, Chen Y, Chen T, et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells with dopamine synthesis for Parkinson's disease in animal models. *NPJ Park Dis.* 2022;8(1):175.

18. Hirunagi T, Sahashi K, Meilleur KG, Katsuno M. Nucleic Acid-Based Therapeutic Approach for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy and Related Neurological Disorders. *Genes* 2022;13(1):109.

19. Day JW, Mendell JR, Mercuri E, Finkel RS, Strauss KA, Kleyn A, et al. Clinical Trial and Postmarketing Safety of Onasemnogene Apeparvovec Therapy. *Drug saf.* 2021;44(10):1109-19.
20. Retson L, Tiwari N, Vaughn J, Bernes S, Adelson PD, Mansfield K, et al. Epithelioid neoplasm of the spinal cord in a child with spinal muscular atrophy treated with onasemnogene abeparvovec. *Mol Ther.* 2023;31(10):2991-8.
21. Stettner GM, Hasselmann O, Tschertter A, Galiart E, Jacquier D, Klein A. Treatment of spinal muscular atrophy with Onasemnogene Apeparvovec in Switzerland: a prospective observational case series study. *BMC Neurol.* 2023;23(1):88.
22. Zhou M, Tang S, Duan N, Xie M, Li Z, Feng M, et al. Targeted-Deletion of a Tiny Sequence via Prime Editing to Restore SMN Expression. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7941.
23. Kotowska-Zimmer A, Przybyl L, Pewinska M, Suszynska-Zajczyk J, Wronka D, Figiel M, et al. A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease. *Mol ther-nucleic acids.* 2022;28:702-15.
24. Wenceslau CV, de Souza DM, Mambelli-Lisboa NC, Ynoue LH, Araldi RP, da Silva JM, et al. Restoration of BDNF, DARPP32, and D2R Expression Following Intravenous Infusion of Human Immature Dental Pulp Stem Cells in Huntington's Disease 3-NP Rat Model. *Cells.*;11(10):1664.
25. Morais RDVS, Sogorb-Gonzalez M, Bar C, Timmer NC, Van der Bent ML, Wartel M, et al. Functional Intercellular Transmission of miHTT via Extracellular Vesicles: An In Vitro Proof-of-Mechanism Study. *Cells.* 2022;11(17):2748.
26. Ferlazzo GM, Gambetta AM, Amato S, Cannizzaro N, Angiolillo S, Arboit M, et al. Genome-wide screening in pluripotent cells identifies Mtf1 as a suppressor of mutant huntingtin toxicity. *Nat Commun* 2023;14(1):3962.
27. Lim CKW, Gapinske M, Brooks AK, Woods WS, Powell JE, Zeballos MAC, et al. Treatment of a Mouse Model of ALS by In Vivo Base Editing. *Mol Ther.* 2020;28(4):1177-89.

28. Rodriguez-Sanchez S, Valiente N, Sesena S, Cabrera-Pinto M, Rodriguez A, Aranda A, et al. Ozone modified hypothalamic signaling enhancing thermogenesis in the TDP-43A315T transgenic model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep.* 2022;12(1):20814.
29. Gao T, Huo J, Xin C, Yang J, Liu Q, Dong H, et al. Protective effects of intrathecal injection of AAV9-RabGGTB-GFP+ in SOD1G93A mice. *Front aging neurosci.* 2023;15:1092607.
30. Tejwani L, Jung Y, Kokubu H, Sowmithra S, Ni L, Lee C, et al. Reduction of nemo-like kinase increases lysosome biogenesis and ameliorates TDP-43-related neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2023;133(16):e138207.
31. Romano G, Holodkov N, Klima R, Feiguin F. TDP-43 regulates GAD1 mRNA splicing and GABA signaling in Drosophila CNS. *Sci Rep.* 2021;11(1):18761.
32. Nizzardo M, Taiana M, Rizzo F, Benitez JA, Nijssen J, Allodi I, et al. Synaptotagmin 13 is neuroprotective across motor neuron diseases. *Acta Neuropathol (Berl).* 2020;139(5):837-53.
33. Wang S, Ichinomiya T, Savchenko P, Wang D, Sawada A, Li X, et al. Subpial delivery of adeno-associated virus 9-synapsin- caveolin-1 (AAV9-SynCavl) preserves motor neuron and neuromuscular junction morphology, motor function, delays disease onset, and extends survival in hSOD1G93A mice. *Theranostics.* 2022;12(12):5389-403.
34. Barbato G, Nistico R, Triaca V. Exploiting Focused Ultrasound to Aid Intranasal Drug Delivery for Brain Therapy. *Front Pharmacol.* 2022;13:786475.
35. Hinderer C, Katz N, Dyer C, Goode T, Johansson J, Bell P, et al. Translational Feasibility of Lumbar Puncture for Intrathecal AAV Administration. *Mol ther-methods clin dev.* 2020;17:969-74.
36. Besse A, Astord S, Marais T, Roda M, Giroux B, Lejeune FX, et al. AAV9-Mediated Expression of SMN Restricted to Neurons Does Not Rescue the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in Mice. *Mol Ther.* 2020;28(8):1887-901.
37. Cui K, Yang F, Tufan T, Raza MU, Zhan Y, Fan Y, et al. Restoration of Noradrenergic Function in Parkinson's Disease Model Mice. *ASN neuro.* 2021;13:17590914211009730.

38. Fernandez-Parrilla MA, Reyes-Corona D, Flores-Martinez YM, Nadella R, Bannon MJ, Escobedo L, et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor transfection in dopamine neurons using neurotensin-polyplex nanoparticles reverses 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration. *Neural regen res.* 2022;17(4):854-+.
39. Salafutdinov II, Gatina DZ, Markelova MI, Garanina EE, Malanin SY, Gazizov IM, et al. A Biosafety Study of Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Transduced with Adenoviral Vector Carrying Human Vascular Endothelial Growth Factor cDNA In Vitro. *Biomedicines*;11(7):2020.
40. Plasschaert RN, DeAndrade MP, Hull F, Nguyen Q, Peterson T, Yan A, et al. High-throughput analysis of hematopoietic stem cell engraftment after intravenous and intracerebroventricular dosing. *Mol Ther.*;30(10):3209-25.
41. Chen C, Guderyon MJ, Li Y, Ge G, Bhattacharjee A, Ballard C, et al. Non-toxic HSC Transplantation-Based Macrophage/Microglia-Mediated GDNF Delivery for Parkinson's Disease. *Mol Ther-methods Clin Dev.* 2020;17:83-98.
42. Weiss AR, Liguore WA, Domire JS, Button D, McBride JL. Intra-striatal AAV2.retro administration leads to extensive retrograde transport in the rhesus macaque brain: implications for disease modeling and therapeutic development. *Sci Rep*;10(1):6970.
43. Jang S, Shen HK, Ding X, Miles TF, Gradinaru V. Structural basis of receptor usage by the engineered capsid AAV-PHP.eB. *Mol ther-methods clin dev* 2022;26:343-54.
44. Pane M, Coratti G, Pera MC, Sansone VA, Messina S, d'Amico A, et al. Nusinersen efficacy data for 24-month in type 2 and 3 spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2022;9(3):404-9.
45. Miller T, Cudkowicz M, Shaw PJ, Andersen PM, Atassi N, Bucelli RC, et al. Phase 1–2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med.* 2020;383(2):109-19.
46. Mendell Jerry R., Al-Zaidy Samiah, Shell Richard, Arnold W. Dave, Rodino-Klapac Louise R., Prior Thomas W., et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1713-22.

47. Rich KA, Wier CG, Russo J, Kong L, Heilman PL, Reynolds A, et al. Premature delivery in the domestic sow in response to in utero delivery of AAV9 to fetal piglets. *Gene Ther* 2022;29(9):513-9.
48. Azevedo MD, Prince N, Humbert-Claude M, Mesa-Infante V, Jeanneret C, Golzner V, et al. Oxidative stress induced by sustained supraphysiological intrastriatal GDNF delivery is prevented by dose regulation. *Mol Ther-methods Clin Dev*. 2023;31:002.
49. Chand DH, Mitchell S, Sun R, LaMarca N, Reyna SP, Sutter T. Research Paper Safety of Onasemnogene Apeparvovec for Patients With Spinal Muscular Atrophy 8.5 kg or Heavier in a Global Managed Access Program. *Pediatr Neurol*. 2022;132:27-32.
50. Soini V, Schreiber G, Wilken B, Hell AK. Early Development of Spinal Deformities in Children Severely Affected with Spinal Muscular Atrophy after Gene Therapy with Onasemnogene Apeparvovec-Preliminary Results. *Child-basel*. 2023;10(6):998.
51. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene apearvovec for presymptomatic infants with two copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy type 1: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022;28(7):1381-+.
52. Jeon MT, Moon GJ, Kim S, Choi M, Oh YS, Kim DW, et al. Neurotrophic interactions between neurons and astrocytes following AAV1-Rheb(S16H) transduction in the hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol*. 2020;177(3):668-86.
53. Capsoni S, Cattaneo A. Getting Into the Brain: The Intranasal Approach to Enhance the Delivery of Nerve Growth Factor and Its Painless Derivative in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Front Neurosci*. 2022;16:773347.
54. Xhima K, McMahon D, Ntiri EE, Goubran M, Hynynen K, Aubert I. Intravenous and Non-invasive Drug Delivery to the Mouse Basal Forebrain Using MRI-guided Focused Ultrasound. *Bio-Protoc*. 2021;11(12):e4056.
55. Blesa J, Pineda-Pardo JA, Inoue K ichi, Gasca-Salas C, Balzano T, Lopez-Gonzalez Del Rey N, et al. BBB opening with focused ultrasound in nonhuman

primates and Parkinson's disease patients: Targeted AAV vector delivery and PET imaging. *Sci Adv.* 2023;9(16):eadf4888.

56. Wang F, Li N, Hou R, Wang L, Zhang L, Li C, et al. Treatment of Parkinson's disease using focused ultrasound with GDNF retrovirus-loaded microbubbles to open the blood-brain barrier. *Open Chem.* 2020;18(1):882-9.

57. PRISMA statement [Internet]. [citado 30 de abril de 2024]. PRISMA statement. Disponible en: <https://www.prisma-statement.org>.

58. Pane M, Berti B, Capasso A, Coratti G, Varone A, D'Amico A, et al. Onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy: predictors of efficacy and safety in naive patients with spinal muscular atrophy and following switch from other therapies. *Eclinicalmedicine.* 2023;59:101997.

59. Gupta R, Santiago-Lopez AJ, Berglund K, Gross RE, Gutekunst CAN. In Vivo Assessment of Cell Death and Nigrostriatal Pathway Integrity Following Continuous Expression of C3 Transferase. *Neuroscience.* 2020;442:183-92.