

La terapia génica cerebral: conquista y horizonte de lo 'nano'

Brain gene therapy: triumph and future of nanotechnology

Rafael Castro *

La terapia génica cerebral consiste en la introducción de ácidos nucleicos en el tejido nervioso con un propósito terapéutico. Mediante la terapia génica (TG) 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. Dicha terapia supone nuevas y excitantes perspectivas para el tratamiento de numerosas enfermedades neurológicas para las cuales no existen tratamientos farmacológicos efectivos. 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 y de una gama de nanopartículas funcionalizadas permite introducir y expresar material genético en el tejido nervioso tras la administración periférica de dichos vectores. Los estudios 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. En el horizonte de la TG se abre la nanotecnología con el desarrollo de nuevos materiales y formación de vectores híbridos que mejoren la eficiencia y selectividad, pero sin olvidar el equilibrio consciente que debe haber entre necesidades humanas e innovación científica-tecnológica.

93

Palabras clave: terapia génica, nanopartículas, cerebro, AAV9, sociedad

Brain gene therapy involves the input of nucleic acids into nerve tissue for therapeutic purposes. The genetic material is indirectly introduced into the blood through non-invasive gene therapy, thereby avoiding direct injection into the brain which can damage the blood-brain barrier. Such therapy offers exciting new treatments for the numerous neurological diseases which lack effective pharmacological treatments. In recent years there has been a dramatic shift in non-invasive strategies for transferring genes into the central nervous system. The development of new serotypes of adenoassociated vectors and of a range of functionalized nanoparticles means that it is now possible to introduce and express gene material in nerve tissue following peripheral administration of the vectors mentioned above. Studies already performed on animals have had highly promising results and it is likely that over the next few years they will give rise to non-invasive gene therapy procedures which will be useful and safe for treating patients. The future of gene therapy nanotechnology will open the development of new materials and formation of hybrid vectors that improve efficiency and selectivity while maintaining the equilibrium that must exist between human needs and scientific-technological innovation.

Key words: gene therapy, nanoparticles, brain, AAV9, society

* Profesor Titular de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, Tenerife, España. Correo electrónico: jrcaastro@ull.es.

Introducción a la terapia génica

En los últimos quince años hemos asistido al inicio de una revolución científica 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. Es el término popular para la construcción y utilización de estructuras funcionales con al menos una dimensión característica medida en escala nanométrica -un nanómetro (nm) es la mil millonésima parte de un metro (10^{-9} m)-. Esto es más o menos cuatro veces el diámetro de un átomo individual. La anchura del ADN es aproximadamente de 2,5 nm y las moléculas de proteína miden 1-20 nm. Dada la inherente nanoescala de los componentes funcionales de las células vivas, era inevitable que la nanotecnología se aplicara en biotecnología, dando lugar al término de “nanobiotecnología”, la cual está empezando a tener un impacto en la salud.

Durante los pasados 50 años, los conceptos iniciales de nanotecnología han dado lugar a numerosas tecnologías, y algunos medicamentos basados en nanotecnología se encuentran en el mercado. La invención del microscopio revolucionó la medicina, al posibilitar la detección de microorganismos, así como el estudio de la histopatología de la enfermedad. La microcirugía supuso un refinamiento considerable sobre la microcirugía y abrió las posibilidades a procedimientos que no se llevaban a cabo con anterioridad o tenían una alta mortalidad y morbilidad. Las nanotecnologías, al abrirse al mundo más allá de la microescala, tendrán un impacto similar en medicina y cirugía. Esto se debe a que los procesos fisiológicos y patológicos a nivel celular ocurren a nanoescala. La nanomedicina es, por tanto, la aplicación de la nanobiotecnología a la medicina. Puede también ser considerada como un refinamiento de la medicina molecular e integra los avances en genómica y proteómica para facilitar el desarrollo de la medicina personalizada. La nanobiotecnología tendrá un impacto en el desarrollo de la nanomedicina, tanto directamente como mejorando otras disciplinas, entre las que se encuentra la terapia génica.

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, como por ejemplo la insulina, no pueden administrarse oralmente. La situación se hace compleja cuando se quiere administrar ácidos nucleicos debido a su tamaño 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 puede considerarse uno de los proyectos más importantes para la humanidad y su futuro, en la medida en que apunta a combatir en sus propias causas las enfermedades de origen hereditario y genéticas en general. La terapia génica se define como la introducción de ácidos nucleicos en células para modificar el curso de una condición médica o enfermedad. Pero decidir si la terapia génica es adecuada para el tratamiento de una enfermedad, implica muchas cosas: la escasez o ineficacia de otros tratamientos, haber identificado el gen o genes alterados en la misma, comprender la biología de la enfermedad, duración, localización, distribución, y la disponibilidad de una copia normal del gen afectado. Inicialmente 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.

1. Vectores de terapia génica

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. Dado que los virus no son organismos vivos, podemos considerarlos como nanomáquinas de la naturaleza, de las cuales la terapia génica modifica algunas piezas, por ejemplo, eliminando las partes del virus que le permiten reproducirse y causar enfermedad, y sustituyéndolas por el transgén. Dentro de los sistemas virales existen, por ejemplo: adenovirus, retrovirus, virus del herpes simplex, lentivirus, adenoasociados... Cada vector viral tiene características particulares, como son la preferencia para reconocer y transferir su material genético a un tipo particular de célula, la capacidad de almacenamiento de genes, la facilidad o no para obtener grandes cantidades de partículas virales. Algunos de los vectores virales que han mostrado su eficacia para transferir genes *in vivo*, por ejemplo, en el sistema nervioso central o 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 (Thomas, 2003: 346-358). En varios casos, se transforman genéticamente algunas líneas celulares para producir neurotransmisores o factores neurotróficos (proteínas que modulan el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia de las neuronas) en grandes cantidades, la conocida terapia génica *ex vivo*, con la finalidad de utilizarse como alternativas terapéuticas en trastornos del SNC (Mejía-Toiber, 2009: 483-489). Sin embargo, los vectores virales generan importantes problemas relacionados con su producción y seguridad (Kaiser, 2002: 2113-2115). 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 (regiones de ADN que controlan la actividad de genes específicos) y en unidades transcripcionales (secuencias de ADN que se activan de una vez), aumentando con ello la posibilidad

de causar efectos adversos (Essner, 2005: 513-519). 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 complejos 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 (Conwell, 2005: 3-18). La nanotecnología puede resolver el problema de selectividad en la terapia génica, es decir, que el transgén llegue sólo a las células que lo necesitan.

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 (Luo, 2000: 893-895), y a que el transgén tiene aún que escapar de la degradación y llegar al núcleo de las células para poderse expresar. La carga eléctrica altamente negativa del ADN también dificulta su transporte, por lo cual se utilizan polímeros o iones con carga positiva para neutralizarla. Los vectores no virales presentan también dificultad para inducir una expresión duradera del gen terapéutico, hecho que enlaza con la regulación de la expresión del gen transferido. Una vez en el núcleo, el gen puede integrarse o no adecuadamente en los cromosomas de la célula, y las necesidades pueden ser diferentes en cada caso. Por ejemplo, en una enfermedad neurodegenerativa es probable que se requiera una expresión prolongada; y en otros casos puede ser suficiente con la expresión transitoria del gen, como en las células cancerosas. Los vectores no virales presentan también dificultad para inducir una expresión duradera del gen terapéutico (Conwell, 2005: 3-18; Pathak, 2009: 1559-1572). 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.

96

2. Nanopartículas que cruzan la barrera hematoencefálica

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 que tapizan el interior de los vasos cerebrales y numerosos pies de astrocitos que tapizan por fuera los vasos cerebrales para regular el paso y difusión de moléculas entre el plasma y el SNC (Loch-Neckel, 2010: 165-174). Las moléculas pequeñas -generalmente inferiores a 500 Daltons (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 (transporte de moléculas a través de una célula) 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.

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. 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 (Thomas, 2003: 346-358). 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. Por tanto, 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.

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, hemos comentado que los vectores virales han sido, sin duda, los más usados. Además, 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. 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 (Tenenbaum, 2002: 451-483), el tratamiento de muchos trastornos neurológicos demanda 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 clínicamente 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 en el tejido nervioso (generalmente por vía sanguínea), 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.

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 estos vehículos a nanoescala de transferencia de fármacos/genes está su habilidad para cruzar las barreras de membrana, particularmente en el SNC. Estas nanopartículas deben ser funcionalizadas de alguna 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 (LaVan, 2003: 1184-1191). Las nanopartículas poliméricas han resultado efectivas en estudios de transferencia génica (Cohen, 2000: 1896-1905). Son partículas 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 (Soppimath, 2001: 1-20). Estas ventajas tienen su origen en dos propiedades básicas. En primer lugar, su pequeño tamaño favorece la penetración a través de pequeños capilares, lo que permite una mayor acumulación del fármaco/gen en el sitio diana (Soppimath, 2001: 1-20). 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 (Kreuter, 2003: 409-416; Nahar, 2006: 259-318). En segundo lugar, el uso de polímeros biodegradables favorece la liberación sostenida de fármacos/genes en el sitio diana durante un largo período (Fang, 2009: 19268-19273).

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 (Jain, 2008: 1035-1052). Además, dichos grupos terminales pueden modificarse para hacer hidrofílico el interior y que su exterior permanezca hidrofóbico, o viceversa (Sahoo, 2003: 1112-1120). Recientemente se ha

demostrado que los dendrímeros pueden ser vectores prometedores de transferencia génica en el cerebro.

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 (Foley, 2002: 116-119). 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 (Selvi, 2008: 3182-3188). 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 (Selvi, 2008: 3182-3188; Wong-Ekkabut, 2008: 363-368). 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 (introducción de ADN exógeno al interior de una célula eucariótica) que deben ser resueltas antes de su aplicación clínica.

99

3. Terapia génica cerebral no invasiva con nanopartículas

En terapia génica de enfermedades que afectan a extensas áreas del cerebro, la estrategia preferida sería administrar los vectores por vía sistémica. El cerebro humano contiene del orden de 100 millones de capilares que abarcan una superficie de aproximadamente 12 m² (Bickel, 2001: 247-279). Prácticamente cada neurona del cerebro tiene su propio capilar, con una distancia media de capilar a neurona de 8-20 μ m (Schlageter, 1999: 312-328). 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 para cruzar la BHE es acoplada/conjugada a un ligando que es reconocido por un receptor que está presente en el lado luminal (por ejemplo, de la luz de un vaso) de las células endoteliales capilares del cerebro. Una vez en la sangre, el complejo proteína/ADN-

1. El el sistema endosomal/lisosomal es el aparato responsable de la digestión intracelular de macromoléculas internalizadas del exterior por los diferentes tipos de endocitosis, y de material intracelularmente generado (autofagia).

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).¹ Este sistema de transporte de proteínas a través de la BHE se ha empleado con éxito para varios factores neurotróficos, pero también como un tipo de nanopartículas detalladas a continuación (inmunoliposomas pegilados, ILP) que contienen ADN que expresa enzimas y factores neurotróficos de interés terapéutico en la enfermedad de Parkinson (Zhang, 2009: 1059-1063).

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 (Jefferies, 1984: 162-163). Para el direccionamiento cerebral con transportadores coloidales de genes se han utilizado fundamentalmente inmunoliposomas pegilados (ILP). La transferencia de ILP 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. Con la administración intravenosa de inmunoliposomas pegilados se ha conseguido expresar un gen antisentido en células de glioma humano (un tipo de tumor del SNC que surge a partir de las células gliales), las cuales habían sido previamente intracerebralmente implantadas en ratón (Zhang, 2002: 183-194). Asimismo, un plásmido de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) fue administrado por vía intravenosa (con ILP) en un modelo de enfermedad de Parkinson producido con la neurotoxina 6-hidroxidopamina, apreciándose la normalización de los niveles de expresión de TH en el estriado (una importante región cerebral relacionada con el control motor) (Zhang, 2003: 1-12).

En los últimos años, los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) han emergido como una clase 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, por ejemplo, ser vehículos de transferencia para oligonucleótidos antisentido y de ARNsi (Kang, 2005: 2099-2106).² 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 (Kim, 2004: 2487-2492).

Una buena eficiencia de transfección se ha conseguido también modificando la superficie de la PAMAM con el aminoácido L-arginina. Las aminas primarias localizadas en la superficie de estos dendrímeros permiten la conjugación con

2. Secuencias cortas de ácidos nucleicos diseñados para unirse a secuencias específicas de ADN y, por tanto, con potencial terapéutico para inhibir la expresión de genes.

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. 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 (Huang, 2007: 1117-1125). 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. Pero sigue habiendo mucha investigación para dar solución a estas cuestiones.

Recientemente se ha descrito la capacidad de un vector viral [un vector adenoasociado tipo 9 (AAV9)] de atravesar la BHE tras infusión intravenosa (tanto en ratones neonatos como adultos) y transducir amplias regiones del cerebro y de la médula espinal (Foust, 2009: 59-65). Los resultados conseguidos son de gran relevancia, dado el alicio interés por desarrollar vectores que pudiesen cruzar la BHE. De esta manera, la inyección intravenosa de AAV9 en animales neonatos producía un patrón de infección predominantemente neuronal, mientras que en animales adultos dicha inyección afectaba a las células gliales (fundamentalmente astrocitos). Es interesante resaltar que la transducción de células gliales mediada por AAV9 sólo se observaba después de la infusión intravenosa, mientras que la inyección directa en el parénquima cerebral inducía el patrón de infección neuronal clásico. ¿Por qué la transducción glial depende de la ruta de administración? Es posible que los receptores de AAV9 sean expresados sólo en los pies de astrocitos que cubren los vasos sanguíneos cerebrales, restringiendo, por ello, el acceso a las neuronas (Abbott, 2005: 5-23).

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 (Manfredsson, 2009: 403-405).

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 enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

Las estrategias actuales de terapia génica de enfermedades neurodegenerativas 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 terapias génicas actualmente en ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson, 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 (el vector base a partir del que se desarrollaron los restantes serotipos de vectores adenoasociados) 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, algunos autores han sugerido que el uso de vectores regulables para la terapia génica humana es innecesario, y podría resultar incluso inadecuado y hasta potencialmente peligroso (Kordower, 2008: 34-40). 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 (Cress, 2008: 30-33). 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)- (Cress, 2008: 30-33), lo cual permitiría ajustar la expresión del transgén hasta alcanzar su máxima eficacia biológica con el menor riesgo de efectos adversos. 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 muchos pacientes neurológicos habitualmente cambian con el curso de la enfermedad (Collier, 2007: 56-65), con lo que el ajuste de la dosis de TGr podría resultar clave para su utilidad a largo plazo. Dado que en un número elevado de casos 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. 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. Por tanto, hay retos pendientes de resolver antes de que la TGr pueda convertirse en una herramienta terapéutica eficiente y segura.

4. El horizonte de la terapia génica

La terapia génica genera mucho debate en todos los ámbitos de la sociedad (políticos, religiosos, jurídicos...) e inquieta al público, debido a numerosas cuestiones éticas. La revolucionaria idea de la terapia génica ofrece la oportunidad de curar enfermedades actualmente incurables, pero al mismo tiempo despierta preocupaciones en el concepto y en su práctica, haciendo que muchos cuestionen sus beneficios. De hecho, consideran que el conocimiento actual no es lo suficientemente bueno como para convencer al mundo de que es un método seguro y efectivo de tratamiento. Sin embargo, la terapia génica ofrece más esperanza que ningún otro tratamiento médico y, por esta razón, no debe darse la espalda a la idea. Como todas las terapias novedosas, la terapia génica cuenta con historias de fracaso, pero también de éxito. El caso más conocido de fracaso es el de Jesse Gelsinger, un paciente con una deficiencia en ornitina transcarbamilasa que falleció en septiembre de 1999, a los 18 años de edad, debido a que en el ensayo clínico hubo complicaciones diversas que llevaron a un fallo multisistémico (Somia, 2000: 91-99; Yarrow, 2009: 4-5). El factor más importante en el desarrollo de la terapia génica es el hecho de que, para los trastornos genéticos, hay sólo una forma de curar la enfermedad: reemplazar el gen defectuoso con una copia sana -y por lo tanto, la terapia génica es la única esperanza de encontrar curas para tales desórdenes. Ha habido también éxitos, en especial para algunas de las enfermedades genéticas asociadas a la visión, en las inmunodeficiencias y otras enfermedades de la sangre, y en algunos tipos de cáncer (Kay, 2011: 316-328; Liu, 2011: 487-495). El uso de la terapia génica en enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas es también prometedor (Greenberg, 2011: 279-281; Kay, 2011: 316-328; LeWitt, 2011: 309-319; Mandel, 2010: 240-247).

103

Según la base de datos de Wiley-InterScience de 2011,³ de un total de 1714 ensayos clínicos de terapia génica registrados, Estados Unidos representa casi el 64% de los mismos, seguido del Reino Unido (11,5 %), Alemania (4,6%), Suiza (2,9%) y Francia (2,6%).⁴ El resto de países, como Australia, Holanda, Bélgica, Canadá y China, no superó el 2% de los ensayos clínicos. En cuanto a las patologías abordadas, las enfermedades cancerosas supusieron un 64,6% de los ensayos clínicos de terapia génica, seguido de las enfermedades cardiovasculares (8,5%), las enfermedades monogénicas (8,3%), enfermedades infecciosas (8,1%) y enfermedades neurológicas (2%). Las enfermedades oculares e inflamatorias constituyeron menos del 2%. Es importante señalar que de todos los vectores empleados en ensayos clínicos, los vectores adenovirales representan un 24,2%, los retrovirus un 20,7%, los vectores de virus adenoasociados un 4,7%, los de virus herpes simplex un 3,3%, y los vectores lentivirales un 2,3%. La administración de ADN desnudo circular (18,7%) y la lipofección (6,4%) fue la categoría de vectores no virales más utilizada en los ensayos clínicos de terapia génica. Cabe indicar también cuáles fueron los tipos de genes transferidos en dichos ensayos: un 20,7% de los

3. Véase www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/.

4. Los ensayos clínicos son evaluaciones experimentales de un producto, sustancia, medicamento, técnica diagnóstica o terapéutica que, en su aplicación a seres humanos, pretende valorar su eficacia y seguridad.

mismos fueron antígenos, seguido de citoquinas (18,5%), supresores tumorales (8,8%), genes de suicidio celular (8,4%) y factores de crecimiento (7,5%), entre otros.⁵ Sin embargo, un 60,7% de los ensayos clínicos de terapia génica comenzaron la fase I, apenas un 3,5% de ellos alcanzaron la fase III, y un 0,1% llegó a la fase IV (sólo dos ensayos), es decir, el seguimiento que se realiza tras su comercialización.

A pesar del escaso porcentaje de ensayos clínicos con capacidad de llegar al público, el desarrollo de nuevos biomateriales y vectores para terapia génica es exponencial. El dogma básico es que los vectores no-virales son menos eficientes pero más seguros. Sin embargo, los vectores virales van ganando cada vez más en seguridad y no-inmunogenicidad (es decir, no generación de respuesta inmune), y los vectores no virales empiezan a asemejarse a los virus, para hacerse más eficientes.

Una vez superados los obstáculos técnicos de la terapia génica, hay temor y preocupación porque la línea entre mejoramiento/refinamiento y terapia termine por desaparecer, y sesgue la percepción de la sociedad de lo que se considera “normal”. Es decir, que ya no sea suficiente tratar y curar un proceso tumoral o una enfermedad neurodegenerativa, sino que se plantee también una terapia génica de la estatura, de mejoramiento visual, de actualización de la memoria... y de lo que la imaginación alcance. Qué duda cabe que estas cuestiones suscitan un debate filosófico, ético, político y social importante, al cual deberá darse una respuesta legislativa amparada en un planteamiento profundo de hacia dónde debe evolucionar el ser humano, sin menoscabo de sus derechos universales.

104

Pero siempre hay que preguntarse si para una condición patológica determinada es justificable la aplicación de una terapia génica. Por poner un ejemplo, para detener la hemorragia en los hemofílicos es necesario realizar transfusiones o inyectar plasma que contenga el factor de coagulación que les falta. Vemos que es plausible dicha intervención terapéutica porque: 1) es una patología crónica; 2) el tratamiento convencional es incómodo (vía intravenosa); 3) se precisa administrar factor de coagulación muy periódicamente; 4) los protocolos de profilaxis en niños, sobre todo, pero también en adultos, precisan hasta tres perfusiones por semana; 5) el tratamiento exógeno puede conllevar riesgos fatales; 6) el tratamiento exógeno puede alterar de forma muy significativa el estado inmunológico del paciente; 7) el tratamiento es muy costoso.

En cualquier protocolo de terapia génica hay que considerar cuatro aspectos básicos: la eficiencia, la especificidad, la persistencia y la toxicidad de la transferencia génica. De igual manera, debe disponerse de un conocimiento profundo de las cuestiones esenciales, como son: qué enfermedad se va a tratar, qué gene/s administramos, qué vector es el más adecuado, cuál es el órgano diana, y qué tipo de administración emplearemos. Todo ello sin olvidar que no sólo el genoma determina el estado de salud, pues cabe preguntarse por qué los gemelos tienen distinta susceptibilidad a las enfermedades si su dotación genética es idéntica. La

5. Citoquinas: conjunto de proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune.

epigenética es el estudio de los cambios heredables en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencias de bases del ADN. Por tanto, puede considerarse un intérprete entre el ambiente y los genes, siendo responsable de que el material genético pueda responder a los cambios ambientales sin variar la información que contiene.

La *National Science Foundation* de Estados Unidos anunciaba en 2004 novedades espectaculares para los próximos 20 años, y remarcaba que se podrá hacer todo lo que la mente humana pueda concebir y más. Solamente con que se lleve a cabo una fracción de las expectativas posibles, la nanotecnología cambiará el mundo en una escala sin precedente en la historia humana. No asoman dudas si uno repasa algunas noticias relacionadas con las aplicaciones nanotecnológicas. Por ejemplo, en enero de 2009 el departamento de Inmunología e Investigación celular de la Universidad de TelAviv publicaba en la revista *Science* los planos de un Nanosubmarino médico, así como un mapa de su inminente viaje inaugural, con capacidad para ser probado en humanos. Mientras los submarinos flotan por el cuerpo, se pegan a las células objetivo y administran un fármaco basado en el ARN interferente (ARNi). Este nuevo tipo de fármaco puede afectar al mecanismo de ARN defectuoso y reprogramar las células para que funcionen normalmente. Así, se consigue que el ARNi restituya la salud a las células enfermas o haga que las células mueran (como en las células cancerosas). Además, será posible dirigir los nanosubmarinos médicos, controlados por ordenador, hacia diferentes patologías, como el cáncer, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas.

Dejando a un lado lo que hasta ahora no dejan de ser noticias médicas sensacionalistas, y a efectos prácticos, queda aún mucho trabajo por hacer. Si estuviésemos hoy en una hipotética consulta médica para un tratamiento de terapia génica y el terapeuta nos preguntara por la elección de una terapia génica con un vector viral o no viral, es fácil imaginar la respuesta. En la frontera inmediata existe un gran reto educativo. En varias universidades ya hay departamentos clínicos de nanociencia, en los que confluyen la física, biología, ingeniería y medicina clínica. El vector ideal para un tratamiento clínico eficiente, seguro y económicamente accesible sólo vendrá del esfuerzo colaborativo entre diferentes profesionales. Dicho vector deberá cumplir los siguientes criterios: 1) que pueda obtenerse a elevada concentración o título; 2) que haya un método fácil y reproducible para su producción; 3) que introduzca el transgén de una manera precisa y estable; 4) que no genere una respuesta inmune en el hospedador; 5) que el transgén pueda ser sometido a regulación externa; 6) que el vector pueda actuar en tipos celulares específicos.

A la revolución de la biología molecular, iniciada en 1953 con el desciframiento de la molécula de ADN, hay que añadir la emergencia en 1976 del sector biotecnológico con la creación de la compañía *Genentech*. Hacia finales de los 80 del siglo pasado se inicia la revolución genómica, que condujo en 2001 al desciframiento del genoma humano por la compañía Celera. A mediados de la primera década del presente siglo, los sectores académicos empiezan a explorar la convergencia entre varias tecnologías, comenzando entonces otra revolución, la de la convergencia. No cabe duda que en el siglo XX hemos desarrollado especialmente una gran capacidad científica y tecnológica. Sin embargo, podríamos preguntarnos a quién sirve

realmente la ciencia y la técnica, y por qué se ha llegado a la situación actual de deterioro del ser humano y del planeta. ¿Qué se está haciendo mal? ¿Qué le falta completar a este desarrollo científico y técnico para poder realmente hablar de un progreso en la humanidad?

A modo de reflexión final, no quisiera terminar sin plantear el observable desajuste entre las necesidades humanas y la innovación científica. Evidentemente, la innovación científica carece de sentido si la gente marginada no puede acceder a los tratamientos o a las tecnologías existentes en la actualidad. Naciones Unidas considera a la nanotecnología como una herramienta importante para lograr sus *Objetivos de Desarrollo del Milenio* (ODM), adoptados en septiembre del 2000. Éstos eran un compromiso que firmaron unánimemente los 189 países de las Naciones Unidas. Con ellos se comprometían, en nombre de la humanidad, a erradicar el hambre y la pobreza, y a garantizar la salud y la sustentabilidad ambiental, hacia el 2015. Pero el informe que cada año emite Naciones Unidas sobre cómo se van cumpliendo los ODM es desalentador, a pesar del creciente desembolso económico para ayuda humanitaria. El Sur global da cuenta de más del 80% de la población, pero únicamente del 10% de las ventas de medicamentos. América del Norte, Europa y Japón cuentan con más de un 85% del mercado farmacéutico global, mientras que en 2005 África tenía acceso a sólo un 1,1% de dicho mercado. Es también sorprendente que el 90% de la investigación y el desarrollo en salud se dedica a patologías que afectan tan sólo al 10% de la población mundial. Es por estos datos por los que antes me he referido al deterioro del ser humano. Los analistas apuntan que los sistemas de suministro de fármacos habilitados con nanotecnología propiciarán que se garanticen y prolonguen las patentes exclusivas, monopólicas, que cubren los compuestos medicamentosos ya existentes. Según *NanoMarkets*, esto puede incrementar la rentabilidad, expandir el acopio de propiedad intelectual de una firma y desalentar a la competencia durante los años más valiosos de un medicamento.

Es sabido que los intereses económicos y monetarios siguen estando por encima del ser humano, de la humanidad y del bienestar común. Hoy hemos apartado al ser humano de la vida, y sólo rige el mundo el beneficio económico. Hemos separado la economía de la actividad cotidiana, y hemos dejado las decisiones de la vida cotidiana en manos de la política, de las grandes empresas, etc. Por ejemplo, es evidente que es el capital el que está dirigiendo hoy día las políticas de los países occidentales. La crisis actual no es económica, es una crisis de ética, de valores y de sentido de la existencia. Hemos separado radicalmente las convicciones, los ideales, las vivencias, del proceso económico. Pero el desarrollo científico y tecnológico debe estar al nivel del desarrollo de la conciencia, y ésta, como comentaba José Saramago, constituye la mejor alternativa contra la uniformidad, el pensamiento único y el neoliberalismo.

Conclusiones

El desarrollo de nuevos serotipos de vectores adenoasociados con capacidad de transducir células del SNC tras ser inyectados periféricamente 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 alcanzar 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. En el horizonte de la terapia génica se abre la nanotecnología con el desarrollo de nuevos materiales y la formación de vectores híbridos que mejoren la eficiencia y selectividad. La administración de genes reparados o la sustitución de genes incorrectos son campos en los que los objetos a nanoescala podrían introducirse con éxito, pero sin olvidar el equilibrio que debe haber entre necesidades humanas, innovación científica y conciencia global.

Bibliografía

107

ABBOTT, N. J. (2005): "Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation", *Cell Mol Neurobiol*, vol. 25, n°1, pp. 5-23.

BICKEL, U., YOSHIKAWA, T. y PARDRIDGE, W. M. (2001): "Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier", *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 46, n° 1-3, pp. 247-279.

COHEN, H., LEVY, R. J., GAO, J., FISHBEIN, I., KOUSAEV, V., SOSNOWSKI, S., SLOMKOWSKI, S. y GOLOMB, G. (2000): "Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles", *Gene Ther.*, vol. 7, n° 22, pp. 1896-1905.

COLLIER, T. J., LIPTON, J., DALEY, B. F., PALFI, S., CHU, Y., SORTWELL, C., BAKAY, R. A., SLADEK JR, J. R. y KORDOWER, J. H. (2007): "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.*, vol. 26, n° 1, pp. 56-65.

CONWELL, C. C. y HUANG, L. (2005): "Recent advances in non-viral gene delivery", *Adv. Genet.*, vol. 53, pp. 3-18.

CRESS, D. E. (2008): "The need for regulatable vectors for gene therapy for Parkinson's disease", *Exp. Neurol.*, vol. 209, n° 1, pp. 30-33.

ESSNER, J. J., MCIVOR, R. S. y HACKETT, P. B. (2005): "Awakening gene therapy with sleeping beauty transposons", *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 5, n° 5, pp. 513-519.

FANG, B. C., DAWSON, M., LAI, S. K., WANG, Y. Y., SUK, J. S., YANG, M., ZEITLIN, P., BOYLE, M. P., FU, J. y HANES, J. (2009): "Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 106, n° 46, pp. 19268-19273.

FOLEY, S., CROWLEY, C., SMAIHI, M., BONFILS, C., ERLANGER, B. F., SETA, P. y LARROQUE, C. (2002): "Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative", *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 294, n° 1, pp. 116-119.

FOUST, K. D., NURRE, E., MONTGOMERY, C. L., HERNÁNDEZ, A., CHAN, C. M. y KASPAR, B. K. (2009): "Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes", *Nat Biotechnol*, vol. 27, n° 1, pp. 59-65.

GREENBERG, A. J., MCCORMICK, J., TAPIA, C. J. y WINDEBANK, A. J. (2011): "Translating gene transfer: a stalled effort", *Clin Transl Sci.*, vol. 4, n° 4, pp. 279-281.

HUANG, R. Q., QU, Y. H., KE, W. L., ZHU, J. H., PEI, Y. Y. y JIANG, C. (2007): "Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer", *FASEB J.*, vol. 21, n° 4, pp. 1117-1125.

108

JAIN, N. K. y GUPTA, U. (2008): "Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability". *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 4, n° 8, pp. 1035-1052.

JEFFERIES, W. A., BRANDON, M. R., HUNT, S. V., WILLIAMS, A. F., GATTER, K. C. y MASON, D. Y. (1984): "Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries", *Nature*, vol. 312, n° 5990, pp. 162-163.

KAISER, J. (2002): "Gene therapy. RAC's advice: proceed with caution", *Science*, vol. 298, n° 5601, pp. 2113-2115.

KANG, H., DELONG, R., FISHER, M. H. y JULIANO, R. L. (2005): "Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides", *Pharm Res*, vol. 22, n° 12, pp. 2099-2106.

KAY, M. A. (2011): "State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead". *Nat Rev Genet*, vol. 12, n° 5, pp. 316-328.

KIM, T. I., SEO, H. J., CHOI, J. S., JANG, H. S., BAEK, J. U., KIM, K. y PARK, J. S. (2004): "PAMAM-PEG-PAMAM: novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier", *Biomacromolecules*, vol. 5, n° 6, pp. 2487-2492.

KORDOWER, J. H. y OLANOW, C. W. (2008): "Regulatable promoters and gene therapy for Parkinson's disease: is the only thing to fear, fear itself?" *Exp Neurol*, vol. 209, n° 1, pp. 34-40.

KREUTER, J., RAMGE, P., PETROV, V., HAMM, S., GELPERINA, S. E., ENGELHARDT, B., ALYAUTDIN, R., VON BRIESEN, H. y BEGLEY, D. J. (2003): "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*, vol. 20, nº 3, pp. 409-416.

LAVAN, D. A., MCGUIRE, T. y LANGER, R. (2003): "Small-scale systems for in vivo drug delivery", *Nat Biotechnol*, vol. 21, nº 10, pp. 1184-1191.

LEWITT, P. A., REZAI, A. R., LEEHEY, M. A., OJEMANN, S. G., FLAHERTY, A. W., ESKANDAR, E. N., KOSTYK, S. K., THOMAS, K., SARKAR, A., SIDDIQUI, M. S., TATTER, S. B., SCHWALB, J. M., POSTON, K. L., HENDERSON, J. M., KURLAN, R. M., RICHARD, I. H., VAN METER, L., SAPAN, C. V., DURING, M. J., KAPLITT, M. G. y FEIGIN, A. (2011): "AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial", *Lancet Neurology*, vol. 10, nº 4, pp. 309-319.

LIU, M. M., TUO, J. y CHAN, C. C. (2011): "Republished review: Gene therapy for ocular diseases", *Postgrad Med J*, vol. 87, nº 1029, pp. 487-495.

LOCH-NECKEL, G. y KOEPP, J. (2010): "La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central", *Rev Neurol*, vol. 51, nº 3, pp. 165-174.

LUO, D. y SALTZMAN, W. M. (2000): "Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface", *Nat Biotechnol*, vol. 18, nº 8, pp. 893-895.

MANDEL, R. J. (2010): "CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease", *Curr Opin Mol Ther*, vol. 12, nº 2, pp. 240-247.

MANFREDSSON, F. P., RISING, A. C. y MANDEL, R. J. (2009): "AAV9: a potential blood-brain barrier buster", *Mol Ther*, vol. 17, nº 3, pp. 403-405.

MEJÍA-TOIBER, J., CASTILLO, C. G. y GIORIANO, M. (2009): "Terapia celular y terapia génica ex vivo: avances en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central", *Rev Neurol*, vol. 49, nº 9, pp. 483-489.

NAHAR, M., DUTTA, T., MURUGESAN, S., ASTHANA, A., MISHRA, D., RAJKUMAR, V., TARE, M., SARAF, S. y JAIN, N. K. (2006): "Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives", *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 23, nº 4, pp. 259-318.

PATHAK, A., PATNAIK, S. y GUPTA, K. C. (2009): "Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery", *Biotechnol J*, vol. 4, nº 11, pp. 1559-1572.

SAHOO, S. K. y LABHASETWAR, V. (2003): "Nanotech approaches to drug delivery and imaging", *Drug Discov Today*, vol. 8, nº 24, pp. 1112-1120.

SCHLAGETER, K. E., MOLNAR, P., LAPIN, G. D. y GROOTHUIS, D. R. (1999): "Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties", *Microvasc Res*, vol. 58, n° 3, pp. 312-328.

SELVI, B. R., JAGADEESAN, D., SUMA, B. S., NAGASHANKAR, G., ARIF, M., BALASUBRAMANYAM, K., ESWARAMOORTHY, M. y KUNDU, T. K. (2008): "Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane impermeable molecule to modulate gene expression in vivo", *Nano Lett*, vol. 8, n° 10, pp. 3182-3188.

SOMIA, N. y VERMA, I. M. (2000): "Gene Therapy: trials and tribulations", *Nature Rev Genetics*, vol.1, n° 2, pp. 91-99.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. y RUDZINSKI, W. E. (2001): "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *J Control Release*, vol. 70, n° 1-2, pp.1-20.

TENENBAUM, L., CHTARTO, A., LEHTONEN, E., BLUM, D., BAEKELANDT, V., VELU, T., BROTHI, J. y LEVIVIER, M. (2002): "Neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease", *Curr Gene Ther*, vol. 2, n° 4, pp. 451-483.

THOMAS, C.E., EHRHARDT, A. y KAY, M.A. (2003): "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy", *Nat Rev Genet*, vol. 4, n° 5, pp. 346-358.

WONG-EKKABUT, J., BAOUKINA, S., TRIAMPO, W., TANG, I. M., TIELEMAN, D. P. y MONTICELLI, L. (2008): "Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes", *Nat Nanotechnol*, vol. 3, n° 6, pp. 363-368.

YARBOROUGH, M. y SHARP, R. R. (2009): "Public trust and research a decade later: what have we learned since Jesse Gelsinger's death?" *Mol Genet Metab*, vol. 97, n° 1, pp. 4-5.

ZHANG, Y., CALON, F., ZHU, C., BOADO, R. J. y PARDRIDGE, W. M. (2003): "Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism", *Hum Gene Ther*, vol.14, n° 1, pp. 1-12.

ZHANG, Y., JEONG LEE, H., BOADO, R. J. y PARDRIDGE, W. M. (2002): "Receptor mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells", *J Gene Med*, vol. 4, n° 2, pp. 183-194.

ZHANG, Y. y PARDRIDGE, W. M. (2009): "Near complete rescue of experimental Parkinson's disease with intravenous, non-viral GDNF gene therapy", *Pharm. Res*, vol. 26, n° 5, pp. 1059-1063.