

# ACTUALIZACIÓN SOBRE NEURODEGENERACIÓN

Laboratorio de Fisiología de la Conducta

I bloque: Febrero-Abril 2005

II bloque: Junio 2005

# SERIES

I. INTRODUCCIÓN

II. PATOGENIA MOLECULAR

III. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

IV. FUTURO EN PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO  
Y TERAPÉUTICA

## Neurodegeneración

Investigar en modelos animales,

\*Posibles mecanismos etiopatogénicos

\*Posibles **tratamientos** sintomáticos,  
curativos y mejor aun **preventivos**

Virus adeno-asociado

integración

**Vector**

amplicón virus

Terapia Genética

Transgen

Plásmido

retrovirus

clonas

lentivirus

ADN

ARN

recombinante

HERPES SIMPLE 1

replicación

Virus "helper"

genoma

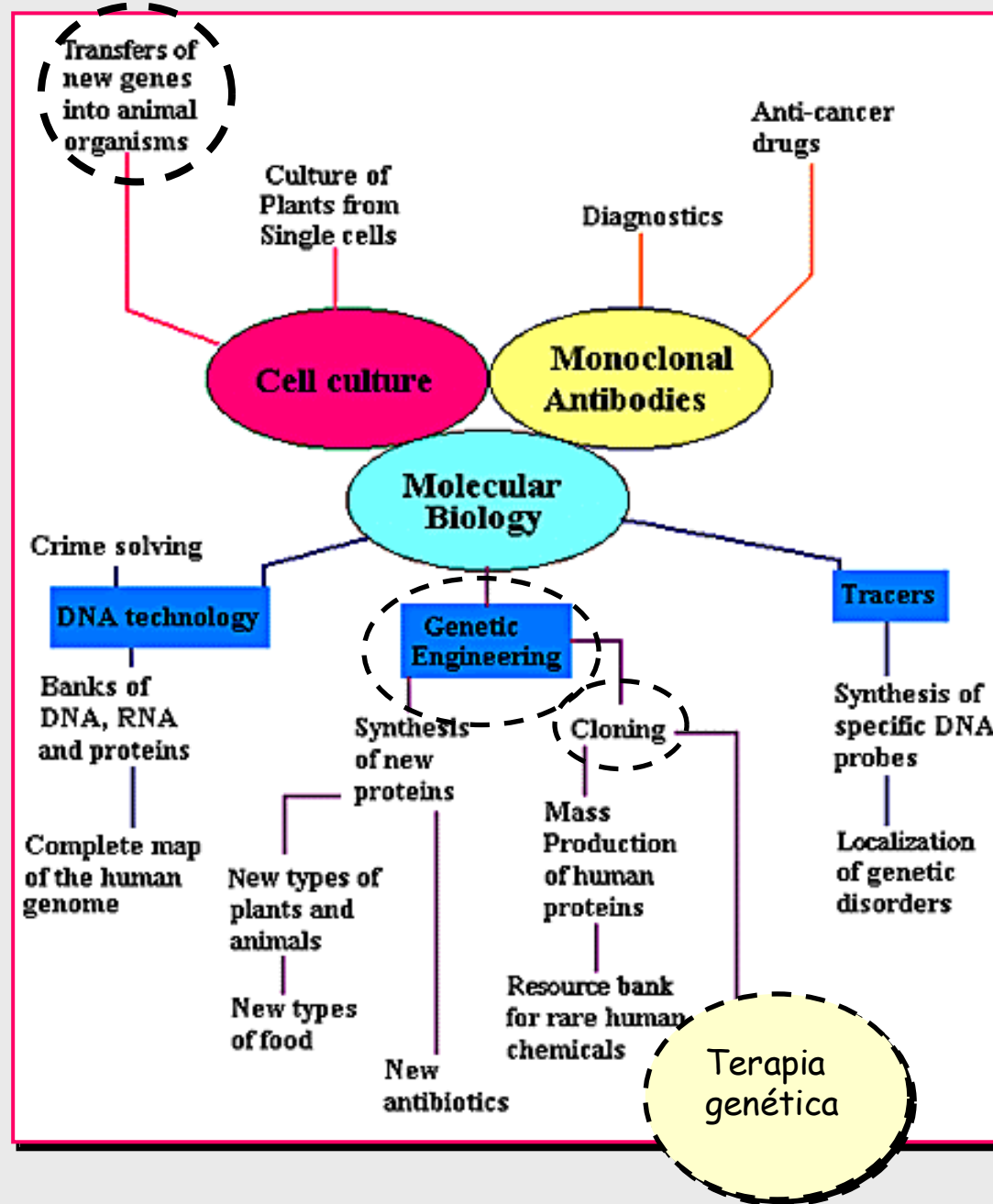
episoma

Bio-tecnología

Ing. Genética

Clonaje

Terapia genética



Una forma de  
PREVENIR O REDUCIR  
la

ENFERMEDAD

es mediante  
TERAPIA GENÉTICA

Es decir,  
cambiando la expresión genética  
de  
PROTEÍNAS

## Terapia Genética

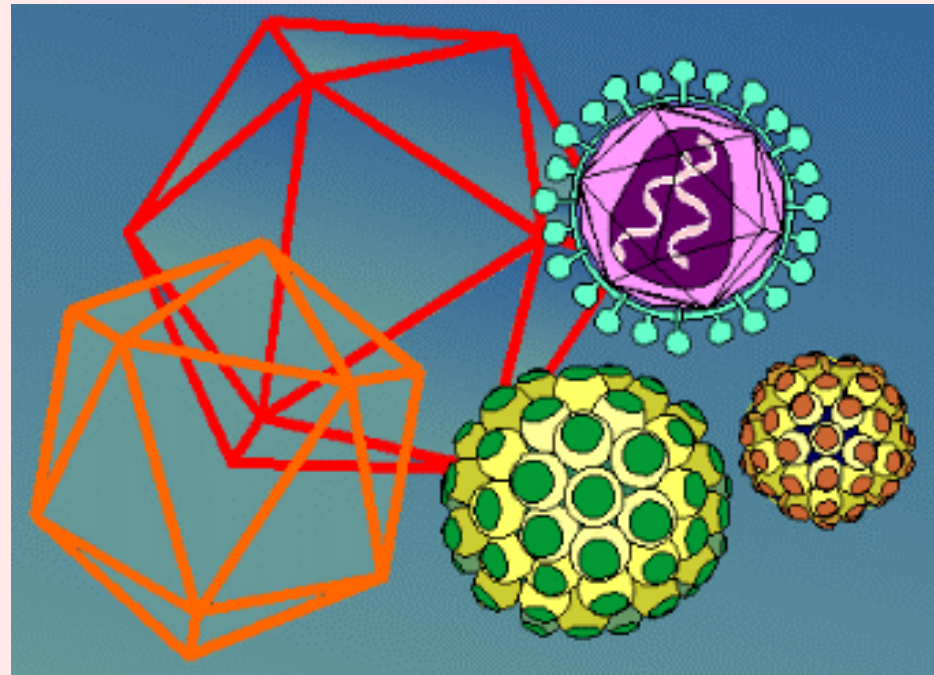
Introducir en la célula blanco un **gen funcional y expresable** para que la **proteína** que se expresa **corrija** el defecto genético

**¿Cómo se puede hacer  
ESTO??**

Administrando secuencias  
particulares de ADN a tejidos  
u órganos blanco



# USO DE VECTORES VIRALES *IN VIVO*



Laboratorio de Fisiología de la Conducta  
2005

Terapia Genética  
es  
MUCHO MÁS que colocar un GEN  
EN un TEJIDO

es ingeniería  
(de ingenio) !!!

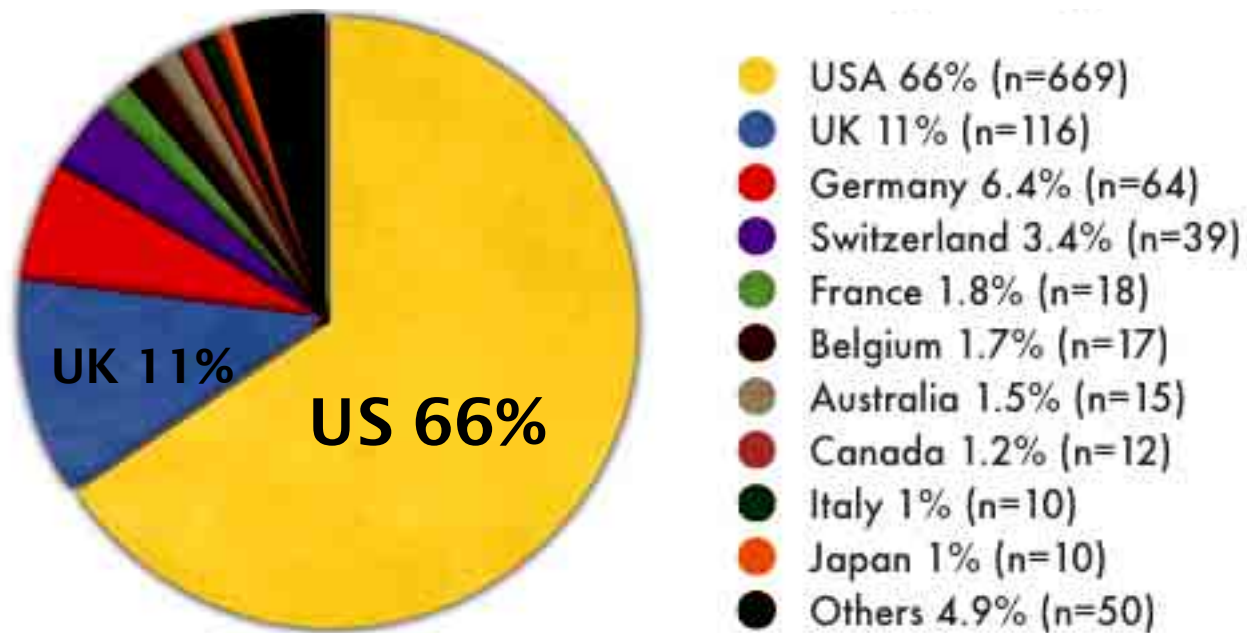
# Aplicaciones

- \* Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas
- \* Terapia genética de enfermedades neurológicas

¿Cómo está actualmente  
la TERAPIA GENÉTICA  
en el mundo?

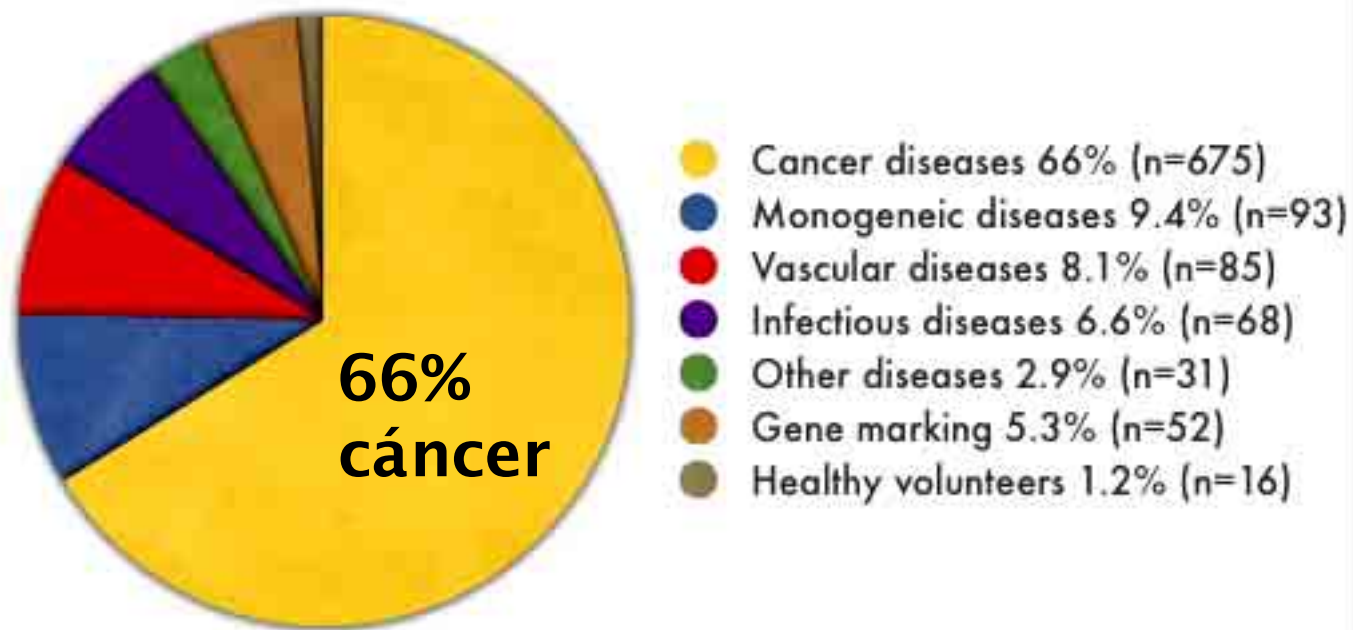
# Epidemiología de Terapia Genética Clínica

## 1. Por país



# Epidemiología de Terapia Genética Clínica

## 2. Por indicación



## **USOS TRANSFERENCIA DE GENES** (no sólo tratamiento)

1. Reemplazo de genes ausentes o defectuosos
2. **Destrucción** de células cancerosas, o hacer que se vuelvan normales
3. **Vacunas**
4. Promoción de **crecimiento de nuevo tejido** o **estimular la regeneración de tejido dañado.**

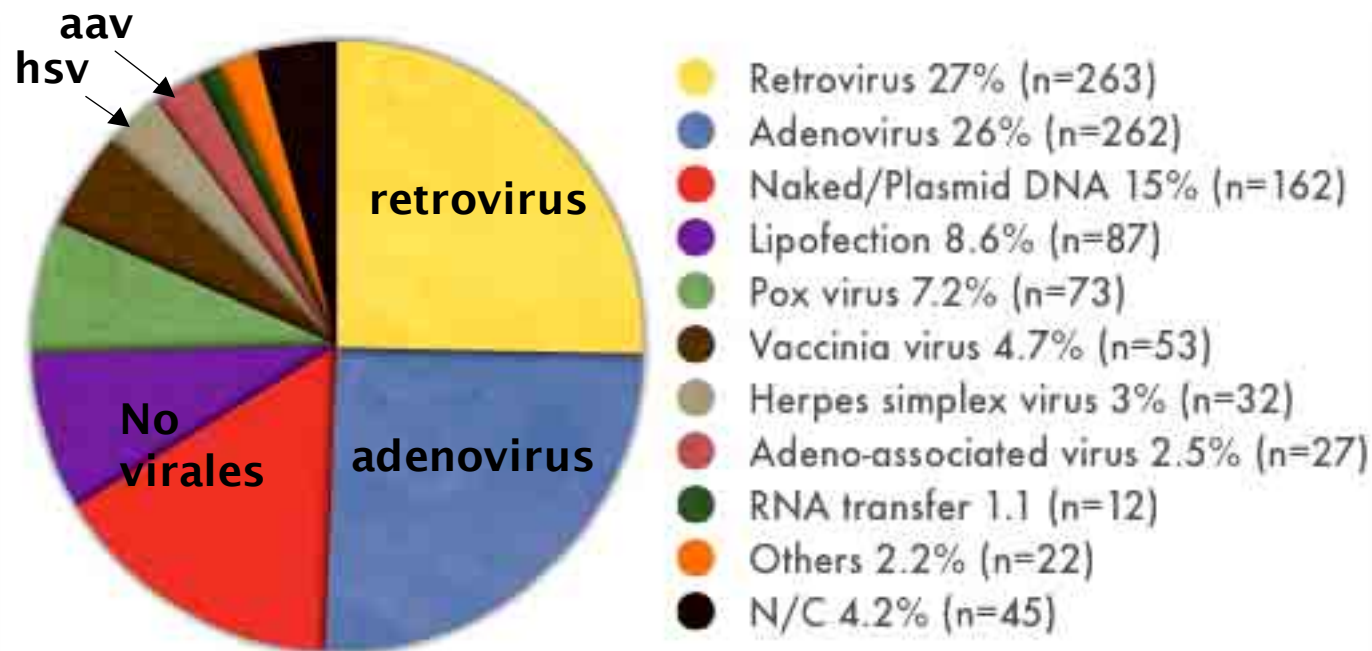
Mientras,  
se continúan dilucidando las  
bases genéticas y moleculares  
de multiplicidad de  
enfermedades,

la promesa  
de la TERAPIA GENÉTICA  
continúa creciendo!!

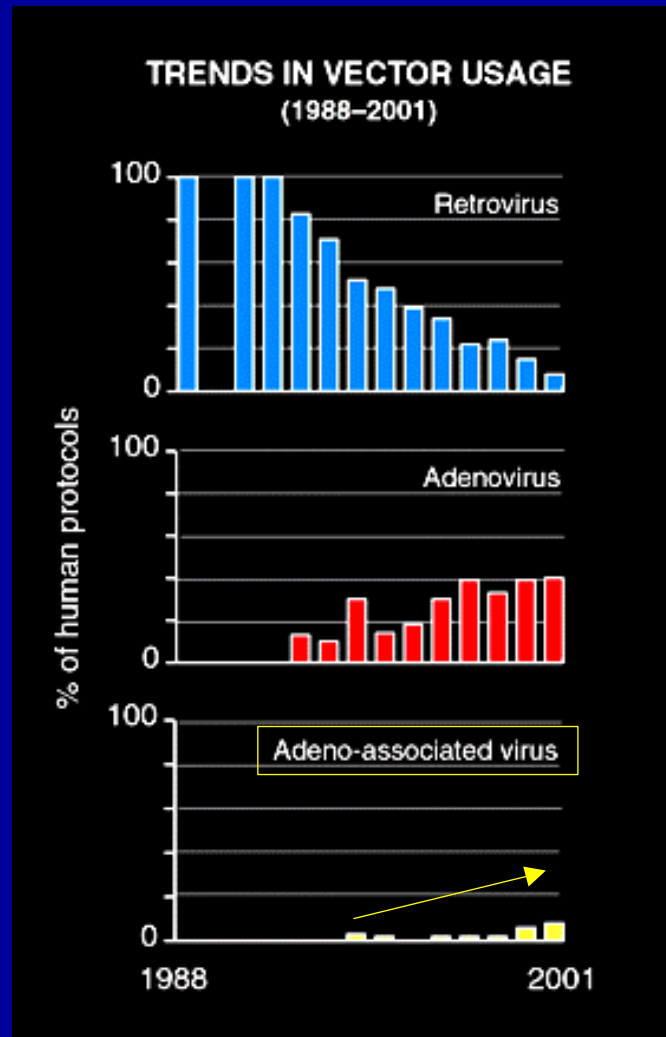


# Epidemiología de Terapia Genética Clínica

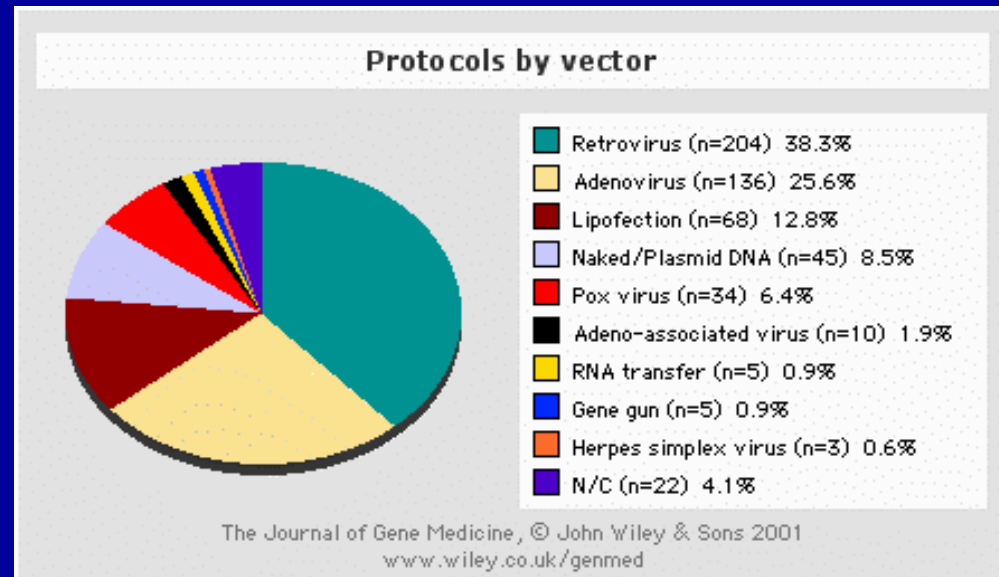
## 3. Por vector



## Uso de vectores virales en clínica



Science 2001 294: 1638



### Protocolos con rAAV

1988-99	24	(11yr)
2000-04	30	(4yr)

*Actualmente, 75% protocolos usan VIRUS...*

## ENSAYOS TERAPIA GENÉTICA 2001

Vector	Estudio	Enfermedades
<b>Viral</b>		
Retrovirus	157	cancer, AIDS, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, hemophilia
Adenovirus	132	cancer, peripheral artery disease, cystic fibrosis, Canavan disease
Pox virus	35	cancer
AAV	7	Prostate cáncer, cystic fibrosis, hemophilia B
<b>Nonviral</b>		
Lipofection <sup>*</sup>	57	cancer, cystic fibrosis, coronary artery disease
Naked DNA	47	cancer, peripheral artery disease and neuropathy, coronary artery disease,
RNA transfer	5	cancer
Gene gun <sup>o</sup>	4	Melanoma, sarcoma

\* Includes liposomes and various packages of lipid, polymer, and other molecules.

o DNA coated on small gold particles and shot with a special gun into target tissue.

SOURCE: THE JOURNAL OF GENE MEDICINE

## Ensayos clínicos abiertos en 2005

### **AAV**

- \* Fibrosis quística
- \* Hemofilia B
- \* Cáncer próstata
- \* Melanoma maligno
- \* Artritis reumatoidea
- \* Vacunas HIV
  
- \* **GAD en Parkinson**
- \* **Distrofia muscular**
- \* **NGF en Alzheimer**

### **HSV1**

- \* **Glioblastoma**
- \* **Proencefalina para dolor intratable**
  
- \* Melanoma metastático
- \* Tumores cabeza y cuello
- \* Mesotelioma maligno
- \* Cáncer colon, mama, estómago, esófago que han extendido a piel

Junio 2005...

## **TERAPIA GENÉTICA PARA INSUFICIENCIA CARDIACA (cerdos)**

Mejoría de insuficiencia cardíaca (clase III) por transferencia directa al corazón de rAAV-gen bomba ATPase 2a del retículo sarcoplásmico (SERCA2a) que regula la contracción miocárdica

**Va a ensayo clínico Fase I en 2006...!!!**

## FASES DE ENSAYOS CLÍNICOS

### 1. **Preclínica Fase 0:**

Exp. *IN VITRO* y en modelos animales

### 2. **Fase I:** pequeño número de pacientes

### 3. **Fase II:** mayor número de pacientes

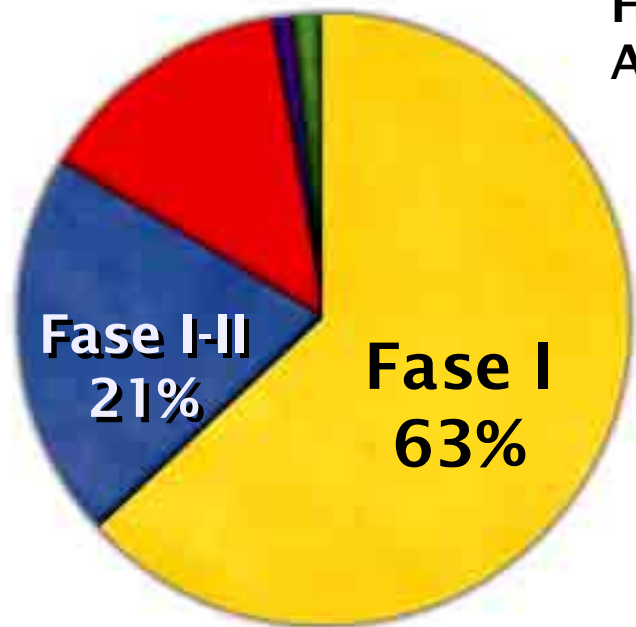
### 4. **Fase III:** gran muestra y análisis completo de eficacia y seguridad

## FASES DE ENSAYOS CLÍNICOS

- Fase I:** para evaluar **seguridad**, rango de **dosis seguras** e identificar **efectos colaterales**
- Fase II:** para ver **efectividad** y evaluar más **seguridad**
- Fase III:** para confirmar **efectividad**, monitorear **efectos colaterales**, **comparar con otros** tratamientos y mayor información de **seguridad**
- Fase IV:** información sobre el efecto en **diversas poblaciones** y los efectos colaterales a **largo plazo**

# Epidemiología de Terapia Genética Clínica

## 4. Por fase clínica



HSV 32 estudios, 0 en fase III  
AAV 17 estudios, 1 en fase III

- Fase I 63% (n=643)
- Fase I/II 21% (n=209)
- Fase II 13% (n=139)
- Fase II/III 1.1% (n=11)
- Fase III 1.7% (n=18)



## Protocolos clínicos sometidos a revisión 2005

### AAV (5)

- \* **EAAT2** (transportador de aa excitadores)  
Médula cervical  
**Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS)!**
  
- \* **NPY**  
Hipocampo  
**Epilepsia intratable del lóbulo temporal!**
  
- \* **SERCA2a** (bomba ATPasa retículo sarcopl.)  
Corazón  
Insuficiencia Cardíaca

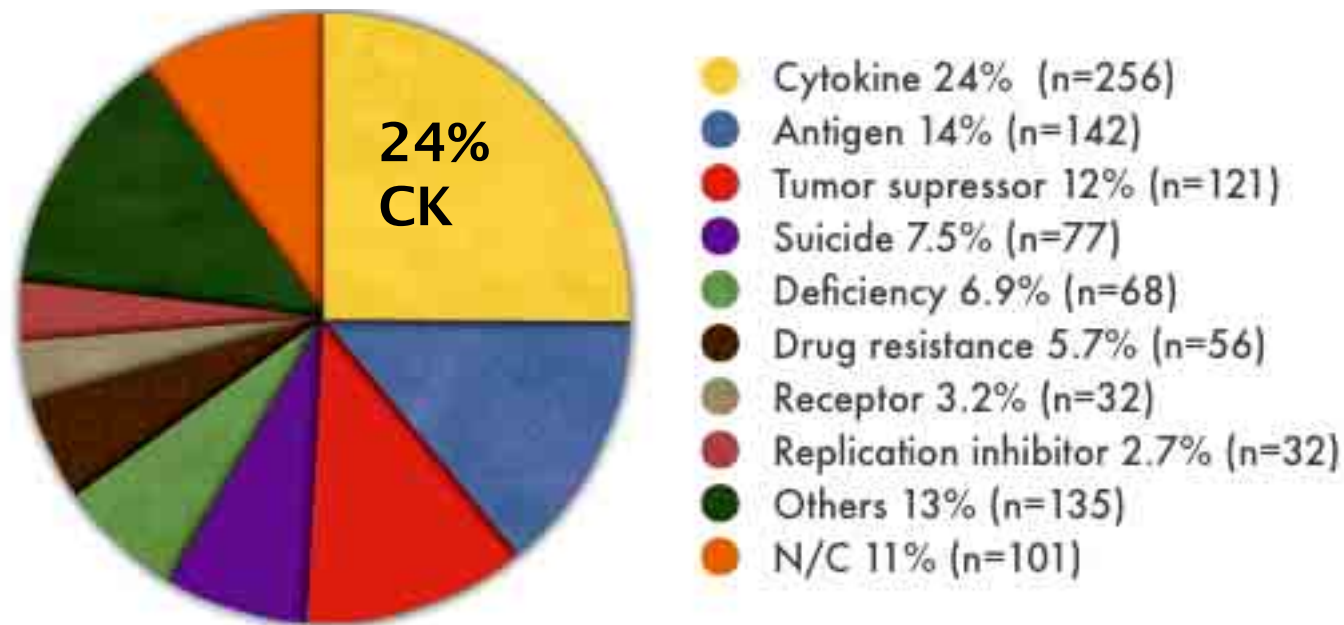
## Protocolos clínicos sometidos a revisión 2005

### HSV1 (2)

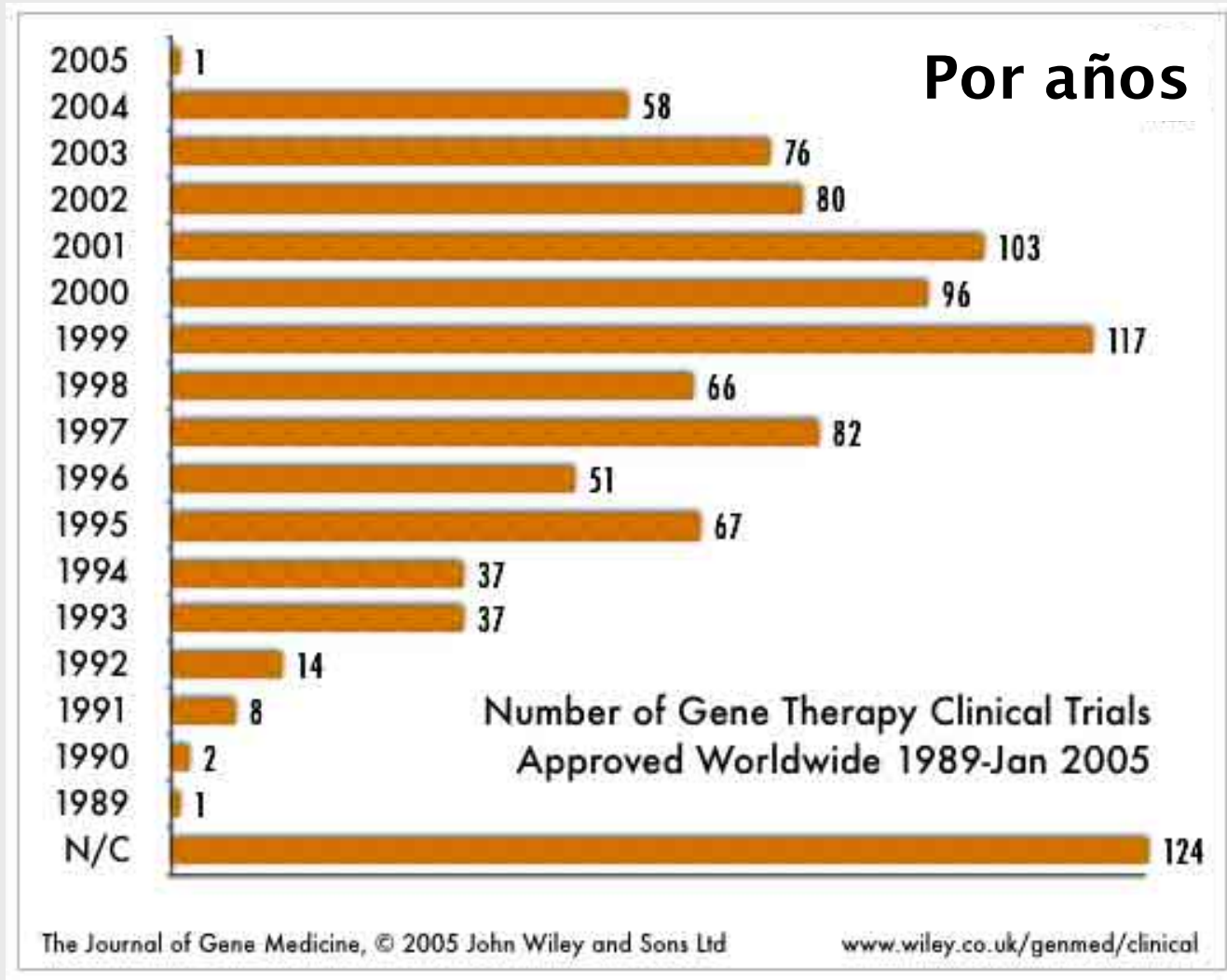
- \* Fase II HSV1 replicación competente  
(ICP 34.5 null mutant)  
Glioblastoma recurrente
- \* Fase I HSV1 mutante c/gen enzima CYP2B1  
Sarcoma Refractario o Neuroblastoma

# Epidemiología de Terapia Genética Clínica

## 4. Por tipo de gen



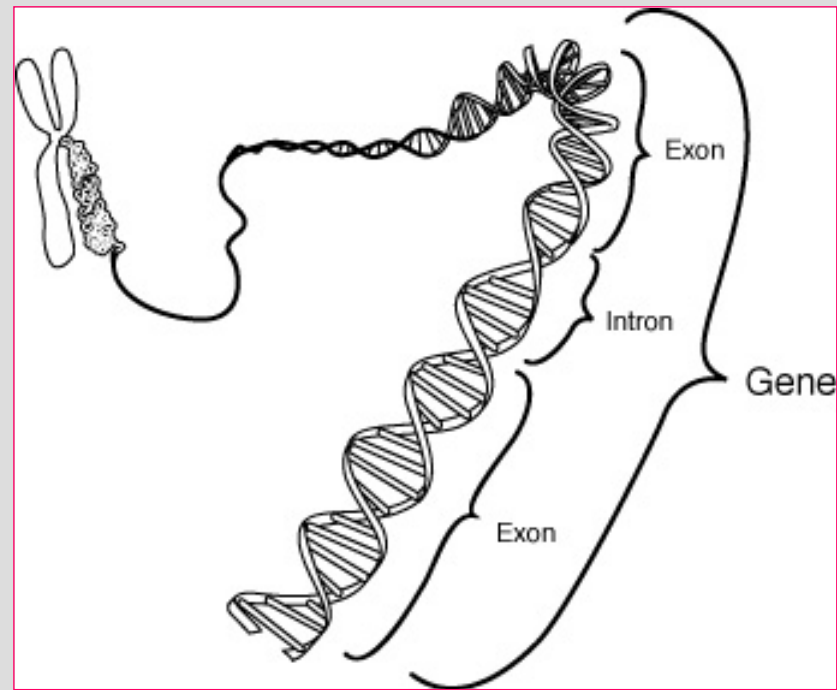
# Epidemiología de Terapia Genética Clínica



**VECTORES**  
**PARA**  
**LLEVAR TRANSGENES**  
**A**  
**Tejidos Blanco**

# GEN

Unidad funcional de herencia que ocupa un lugar específico en un cromosoma  
Constituido por secuencias específicas de nucleótidos requeridas para hacer un sólo polipéptido



# TRANSGENE

El gen seleccionado para transferencia genética llevado por el vector al blanco

Ej., la versión corregida del gen CFTR administrado por la vía aérea para tratar a un enfermo de fibrosis quística

# TRANSFERENCIA GENÉTICA

## \*A líneas germinales

Óvulos o esperma para alterar el contenido genético de generaciones futuras

## \*Somática

A tejidos no germinales para corregir la enfermedad de un individuo



# TRANSFERENCIA GENÉTICA

## \* *Indirecta ex vivo*

A células localizadas FUERA del huésped  
Luego estas células son implantadas dentro del huésped.

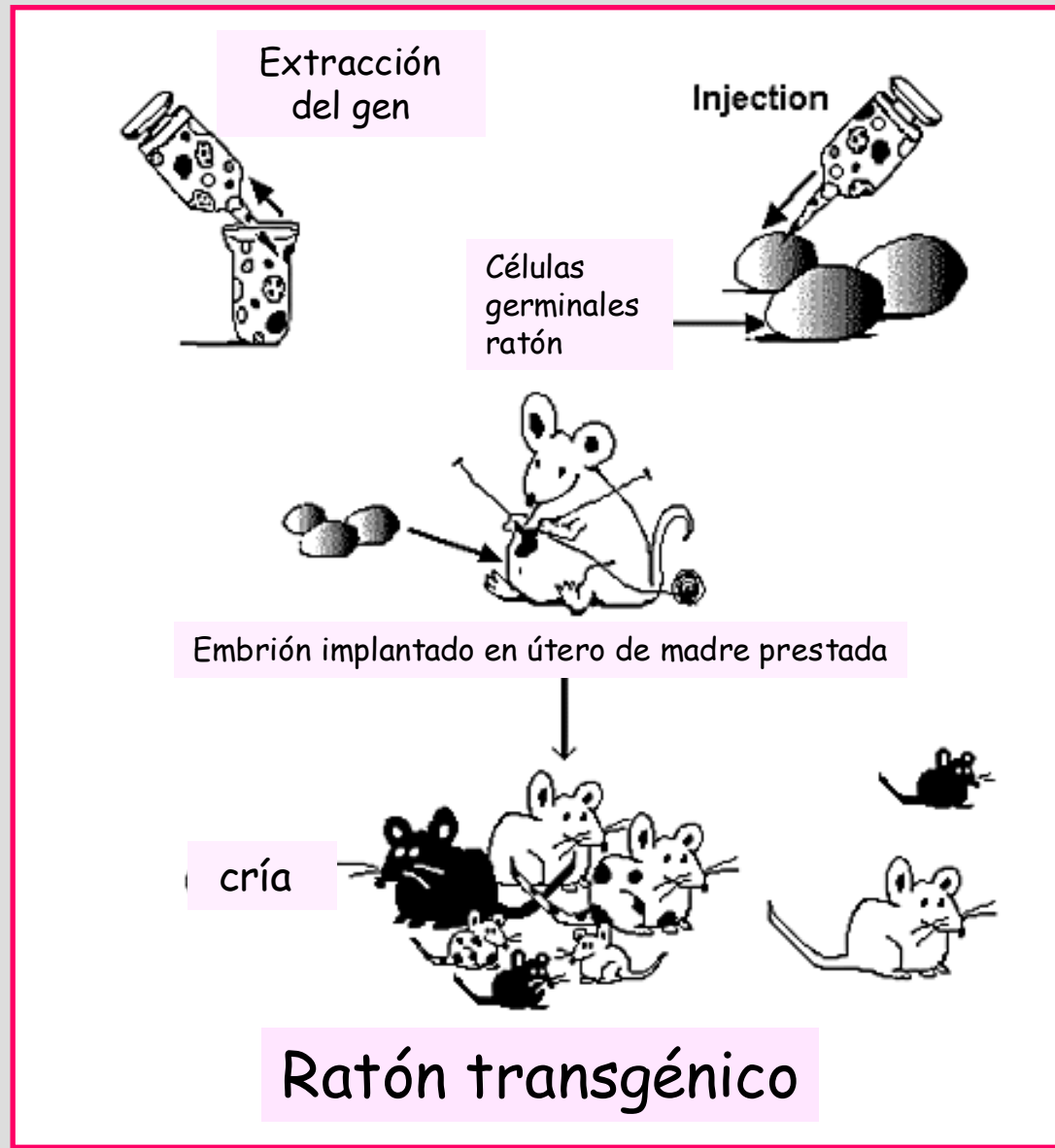
## \* *Directa in vivo*

A células localizadas DENTRO del huésped

Transgen



A líneas germinales



# VECTOR

Vehículo para llevar ADN experimental y clonarlo, provee todas las secuencias esenciales para replicar el ADN

- \* Vectores No virales
- \* Vectores Virales

# VECTORES

## \* NO virales o SINTÉTICOS

Liposomas,  
ADN con proteínas  
ADN desnudo

°No infecciosos, no muy tóxicos  
°Transgenes grandes pero,

°Blanco inespecífico  
°Transfección baja  
°Expresión transitoria

**\* VECTORES VIRALES**

# ¿QUÉ es un Virus?

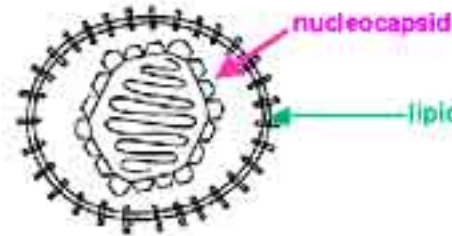
- Parásito intracelular obligado de naturaleza viva, pero no de naturaleza celular
- Depende de la célula huésped para energía, precursores, enzimas y ribosomas para multiplicarse
- Consiste en ADN o ARN rodeado de cubierta proteica (cápside), algunos tienen envoltura externa
- Tamaño: 20-300 nm \* mimivirus 800 nm!

# 5 TIPOS DE SIMETRÍA VIRAL

Icosahedral nucleocapsid



ICOSAHEDRAL

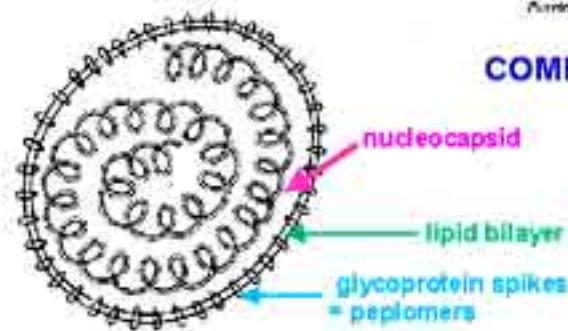


ENVELOPED ICOSAHEDRAL

helical nucleocapsid



HELICAL

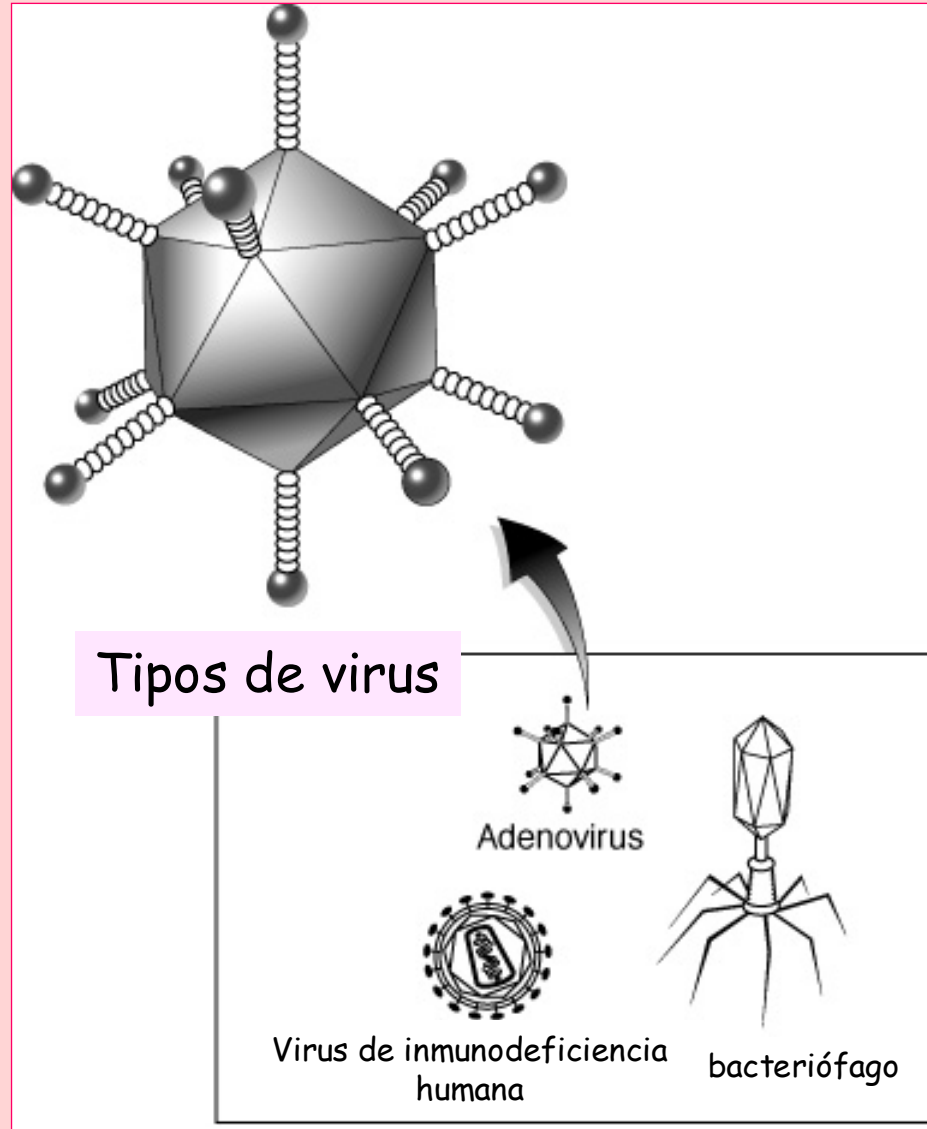


ENVELOPED HELICAL

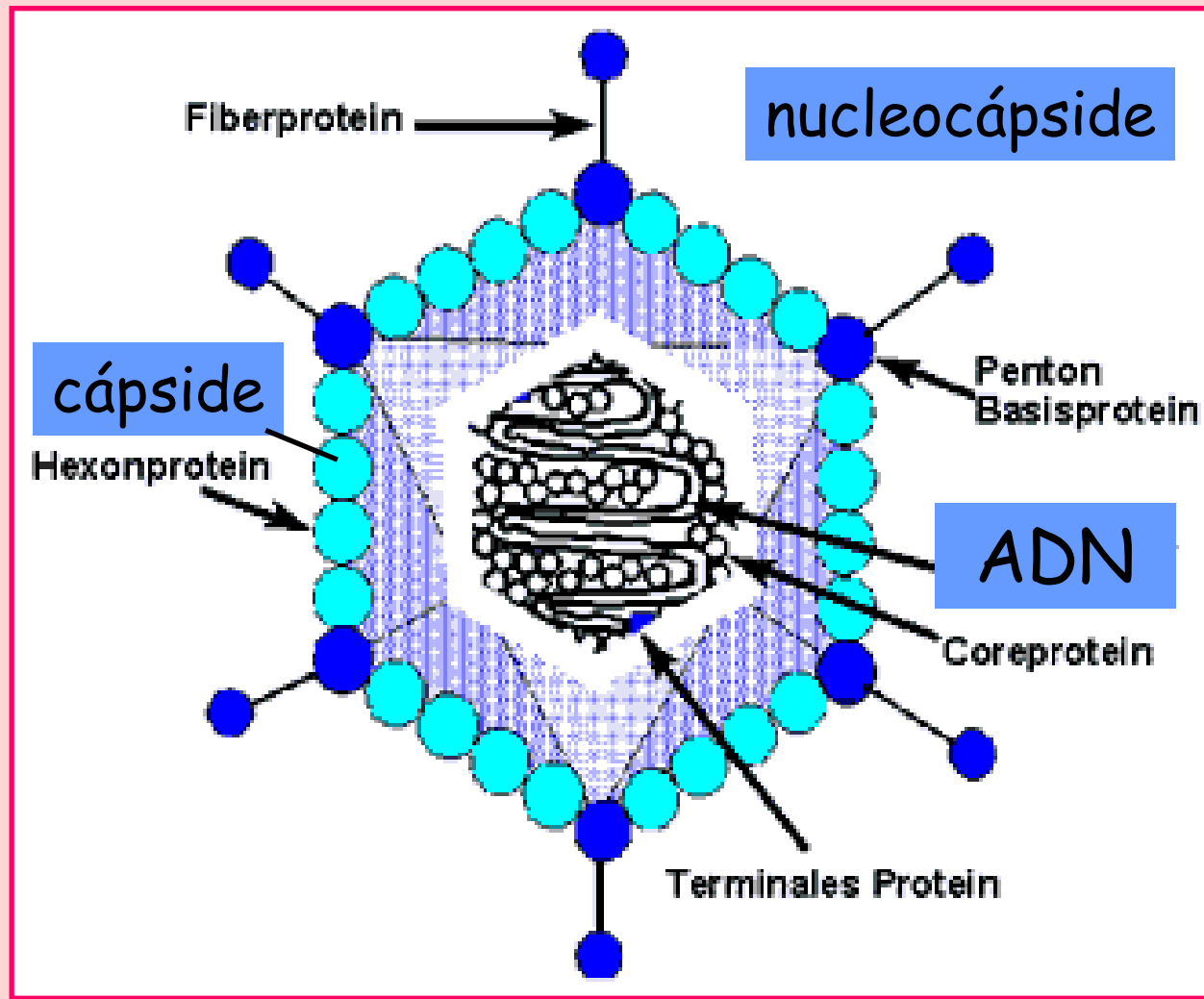


COMPLEX

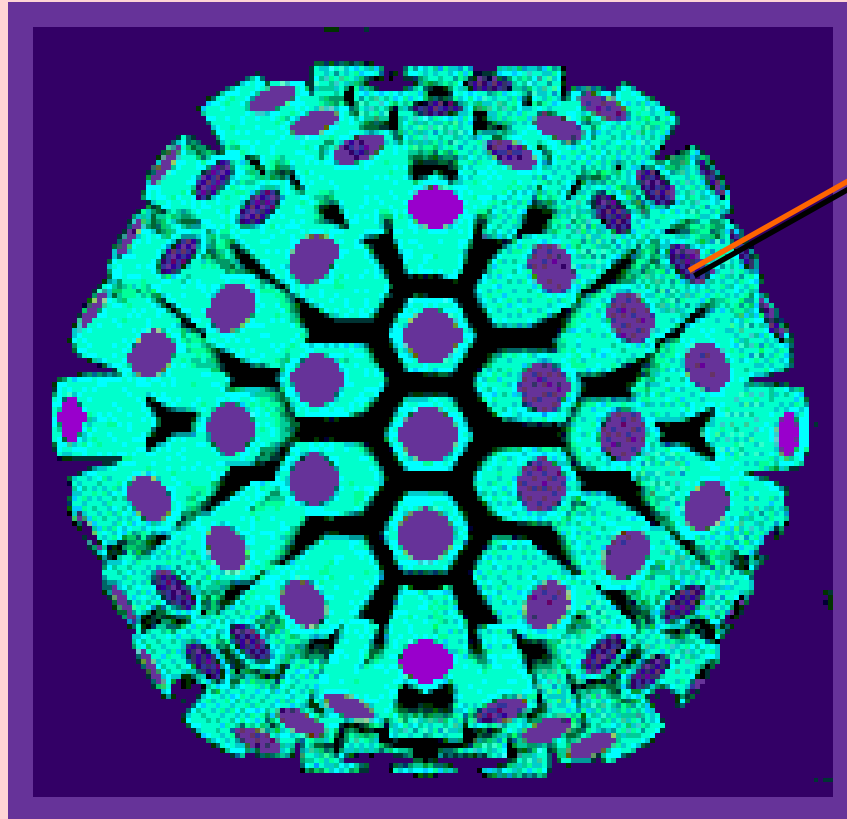
Adapted from Schaeter et al., Mechanisms of Microbial Disease





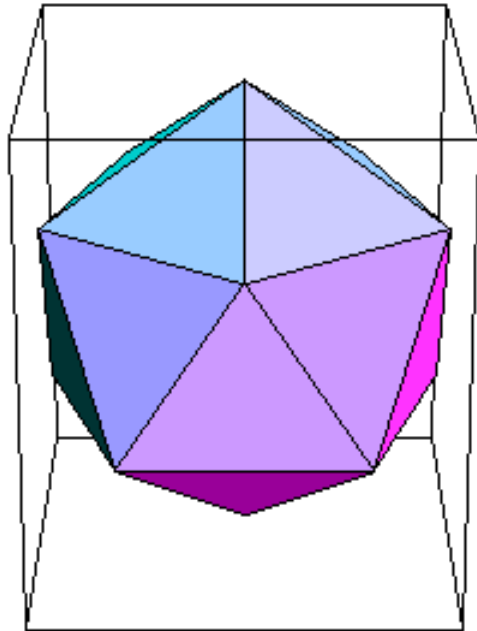


Estructura típica de un virus icosaedro



Capsómeros  
"clusters" de  
unidades  
funcionales

Cápside HSV1



## Virus Estructura Icosahedral

20 caras triangulares,  
12 vértices y 30 lados

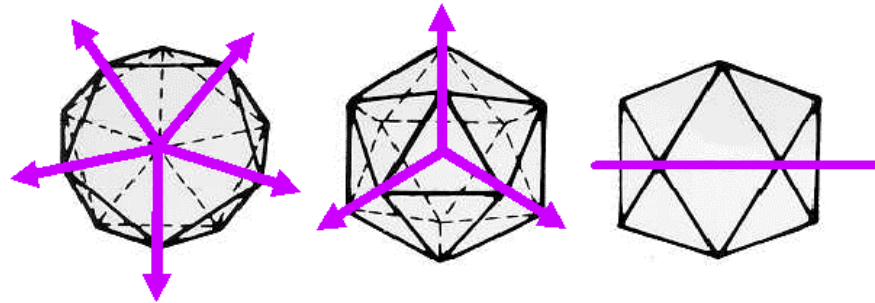
SIMETRÍA ICOSAHEDRAL



Balón de fútbol  
Figura geométrica con 20 caras

icosa: gr. *Eikosi* veinte  
hedron: gr. Fig. geométrica  
con muchos lados

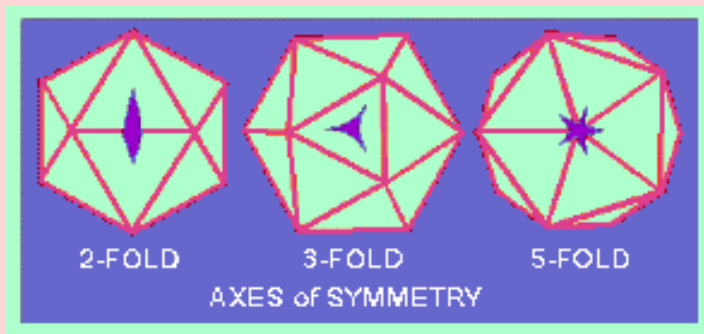
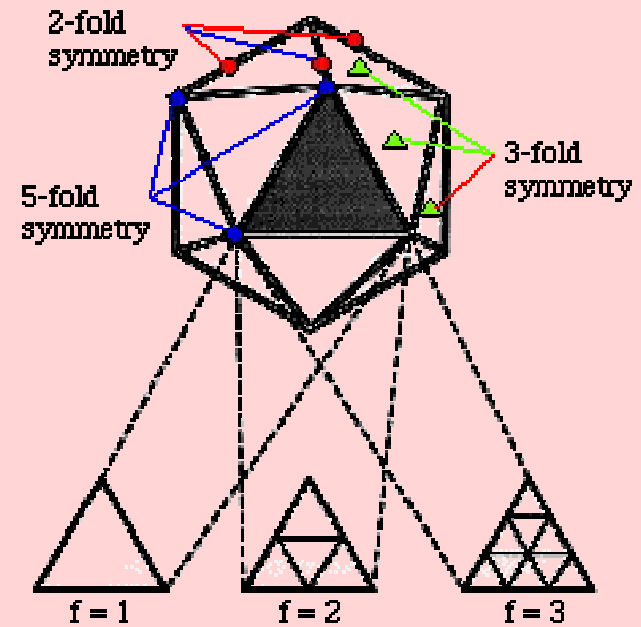
# ICOSAHEDRAL SYMMETRY



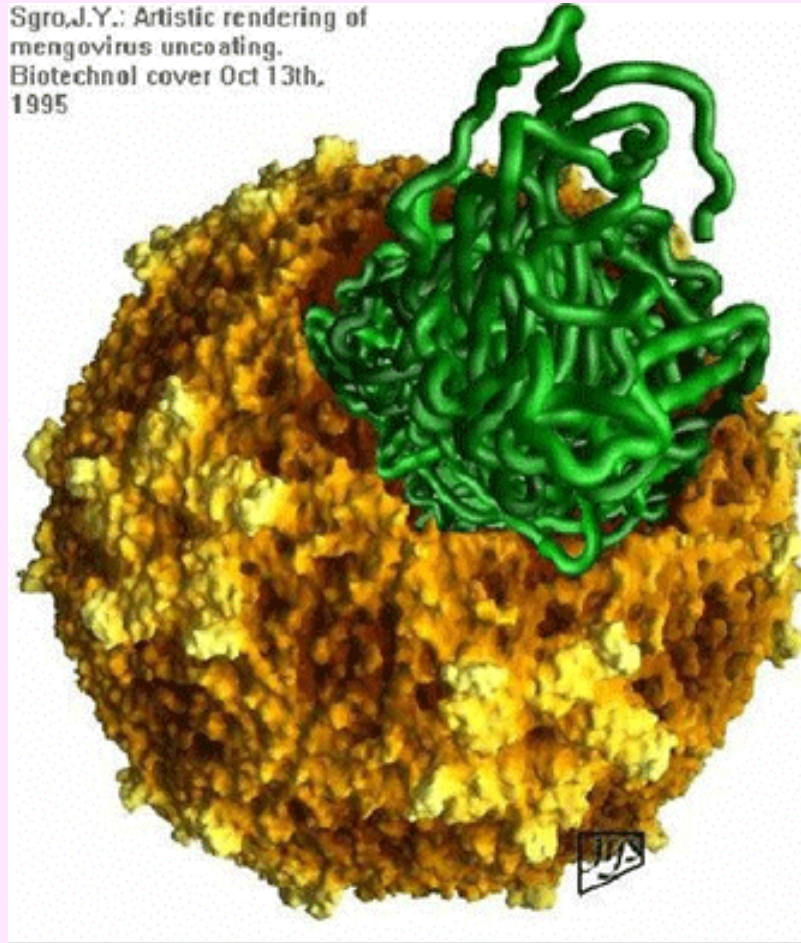
**5-FOLD**

**3-FOLD**

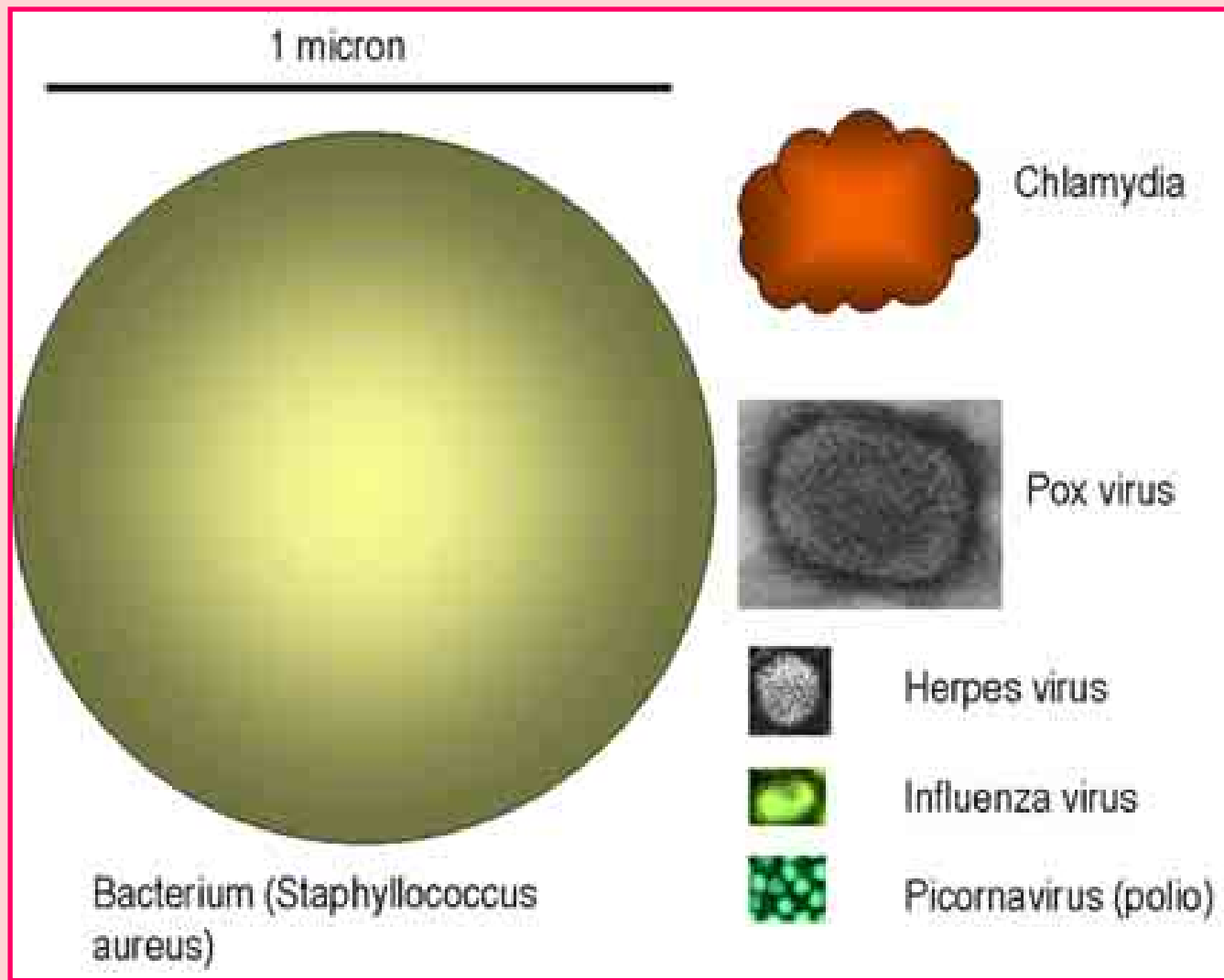
**2-FOLD**



Sgro, J.Y.: Artistic rendering of  
mengovirus uncoating.  
Biotechnol cover Oct 13th,  
1995



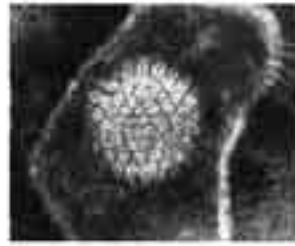
Ácido nucleico saliéndose de la cápside



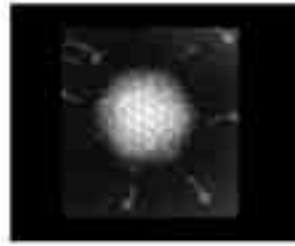
Tamaños de virus comparado con bacterias



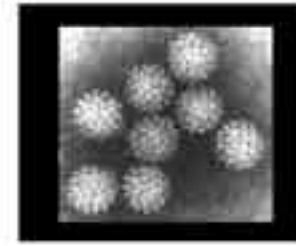
Poxviridae



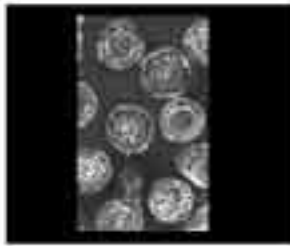
Herpesviridae



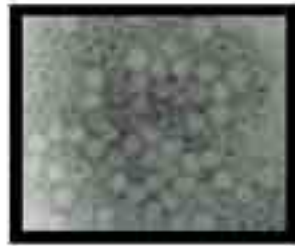
Adenoviridae



Papovaviridae  
human papilloma



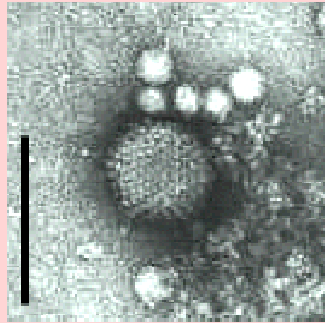
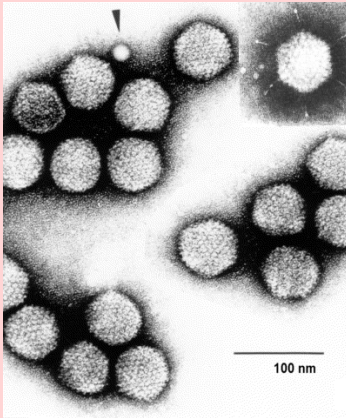
Hepadnaviridae



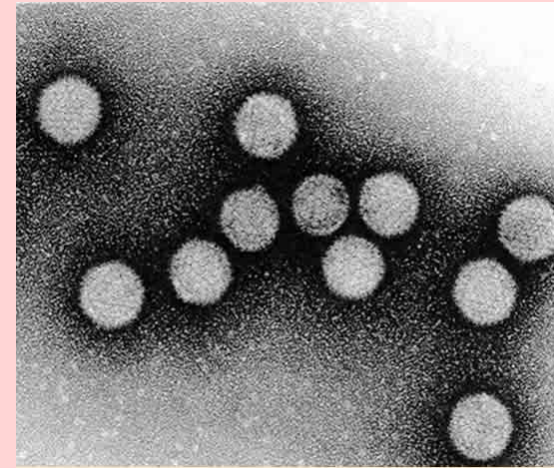
Parvoviridae

## DNA Viruses

— 100 nanometers

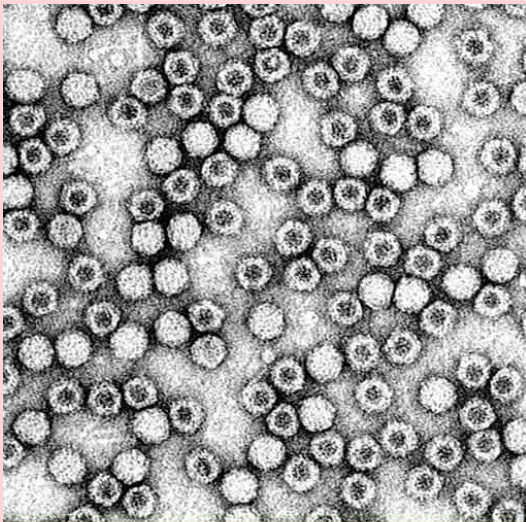


AAV particles around a single adenovirus. Bar=100nm.

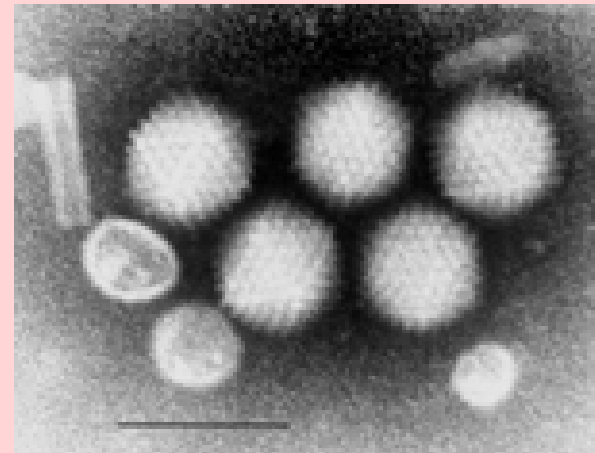


Adeno virus

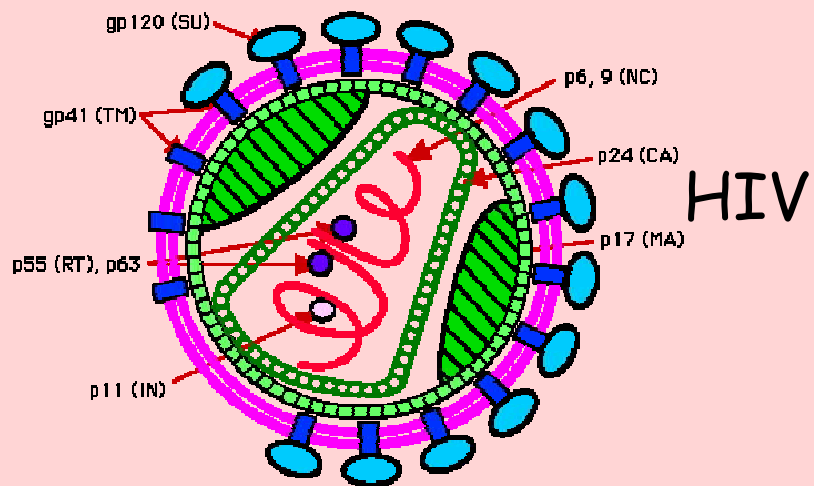
## Advirus y AAV



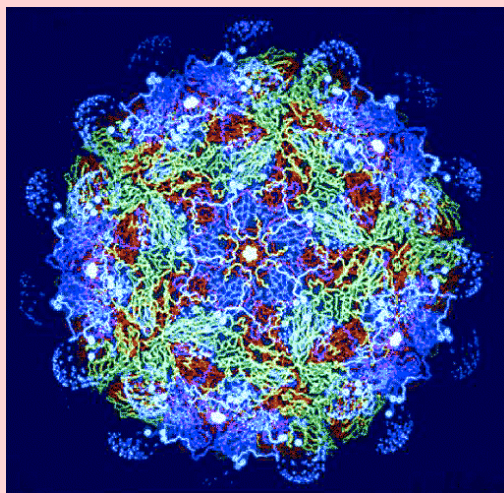
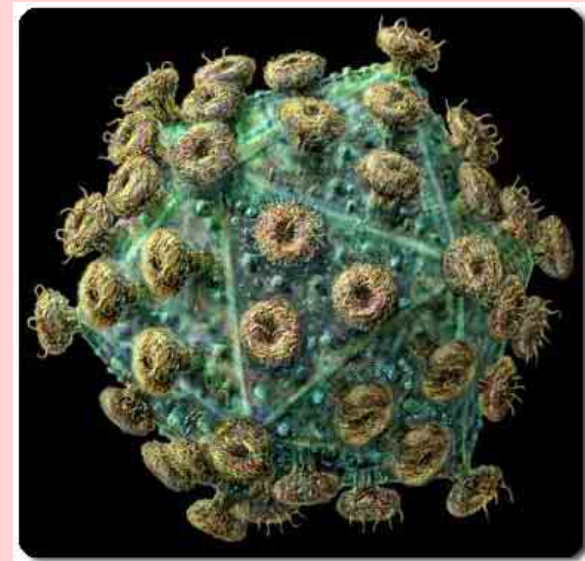
Adeno-associated virus



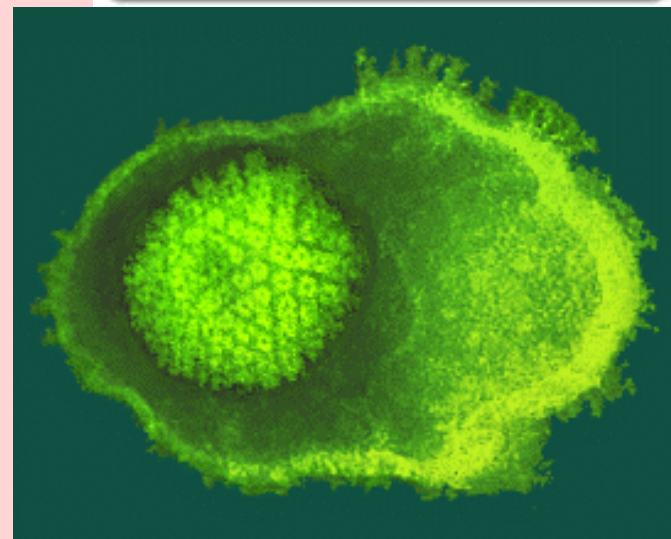




HIV

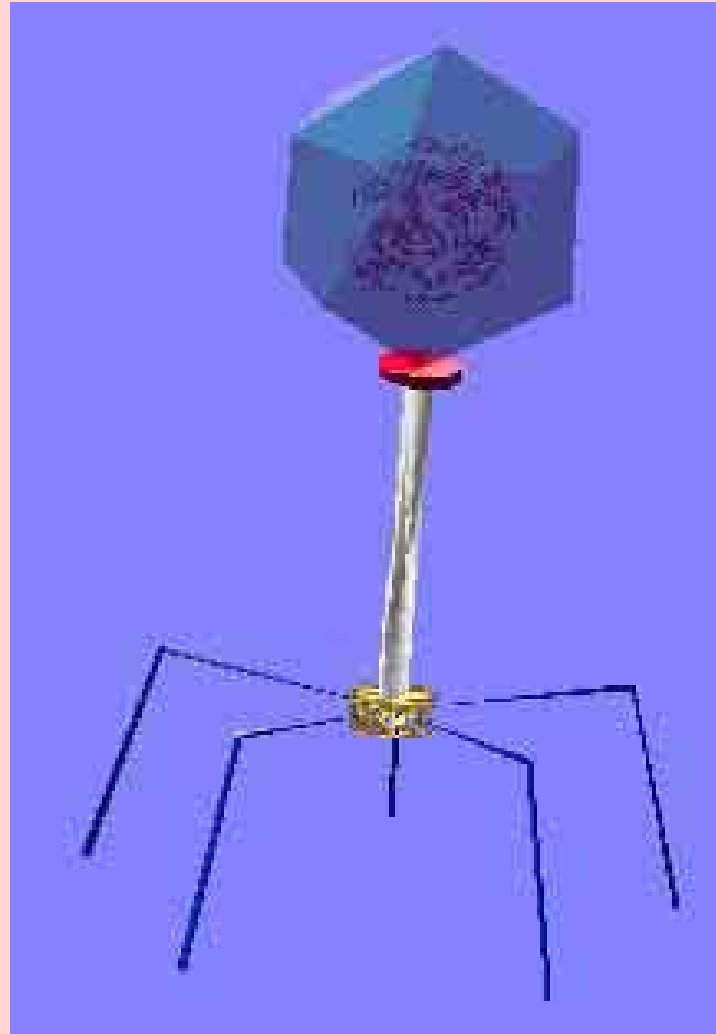


HSV



Virus enfermedad boca pies

BACTERIÓFAGO  
Estructura compleja  
Virus de bacterias



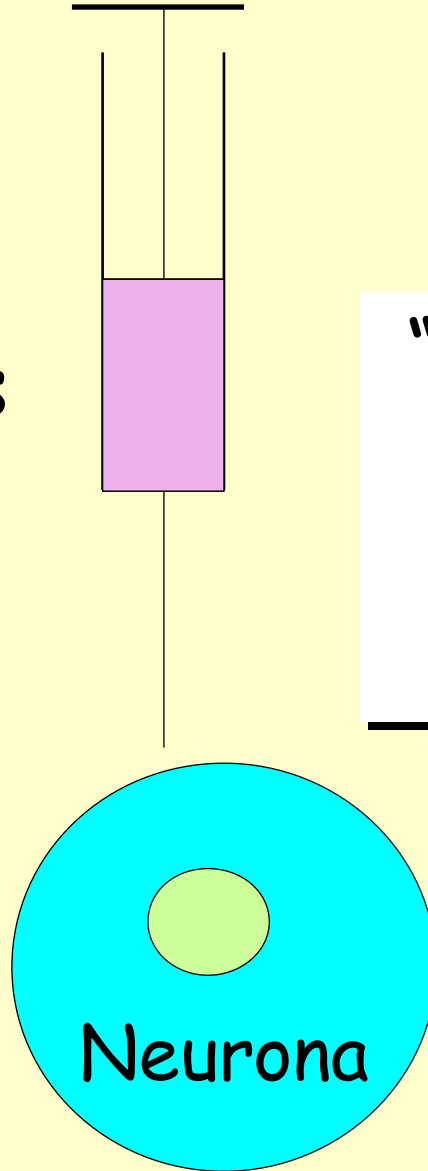
Transferencia directa  
(*In Vivo*)

GENES al CEREBRO

por  
VECTORES VIRALES

¿Por qué los VIRUS pueden  
ser usados como  
VEHÍCULOS or VECTORES?

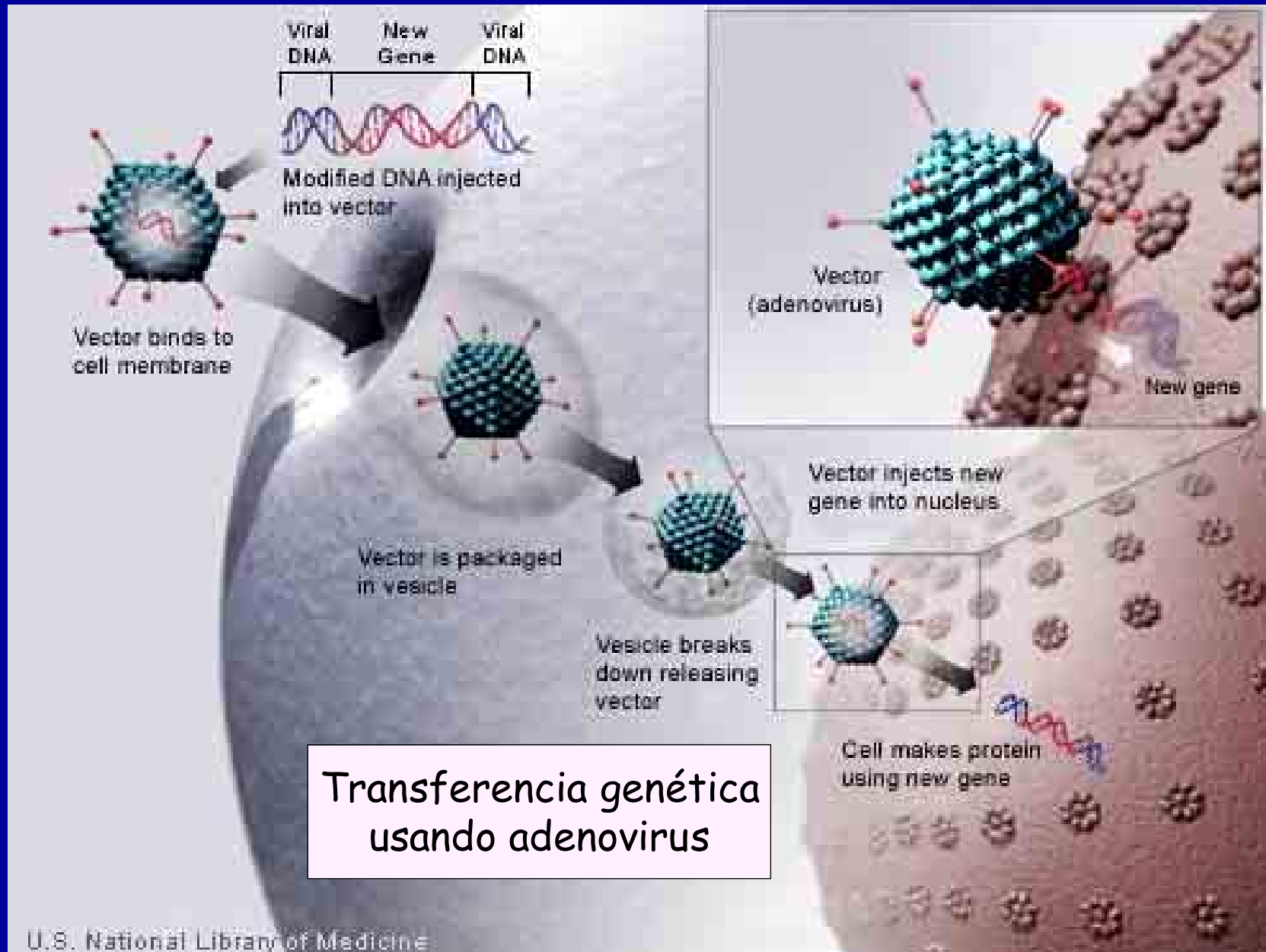
**Virus**

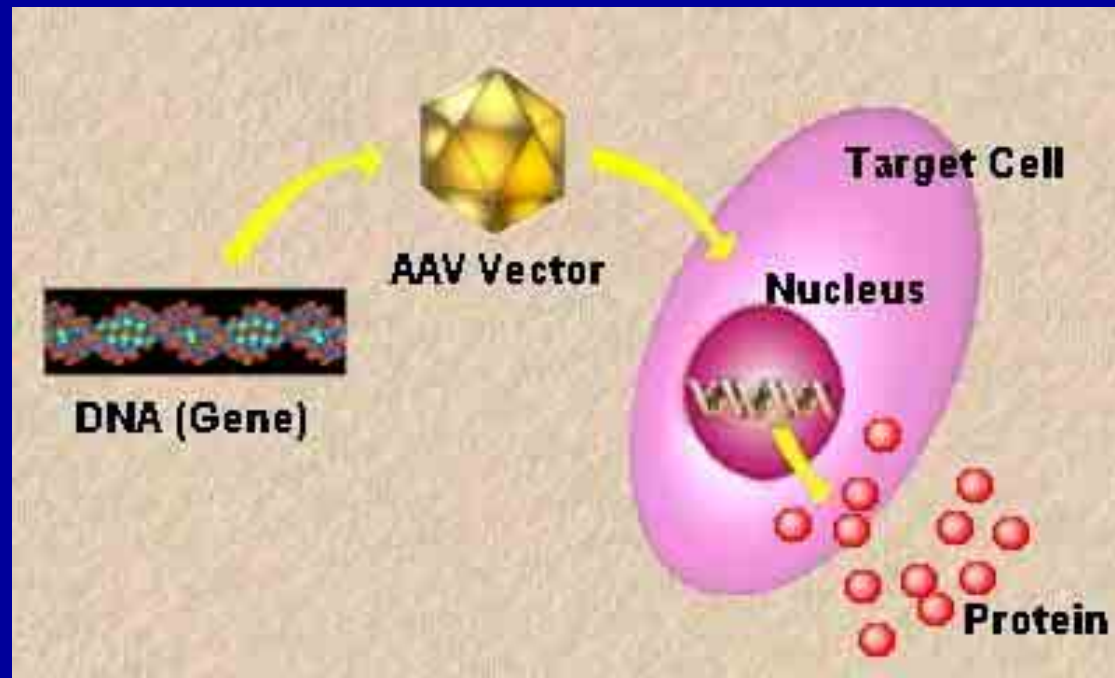


"jeringas naturales"  
para  
inyectar ADN a  
células

## Los VIRUS

- \* Están diseñados para infectar células
- \* Son muy eficientes en transfectar su propio ADN en la célula huésped





## **VECTORES VIRALES**

Herramientas de trabajo para introducir material genéticos en la célula blanco



## VIRUS como VECTORES

Introducen ADN extraño en las células blanco y utilizan la maquinaria celular para su transcripción

Los virus  
necesitan ser  
**MODIFICADOS**

para ser utilizados como  
**VECTORES**

Tienen que ser,

\* DEFICIENTES PARA SU REPLICACIÓN:

- se eliminan regiones codificadoras de algunas proteínas estructurales-  
y se reemplazan por genes de interés

Pero deben mantener su,

\* HABILIDAD DE INTRODUCIRSE en las células blanco

# VECTORES VIRALES

\* Retrovirus

\* Adenovirus

\* Virus Adeno-asociado

\* Virus Herpes Simple 1

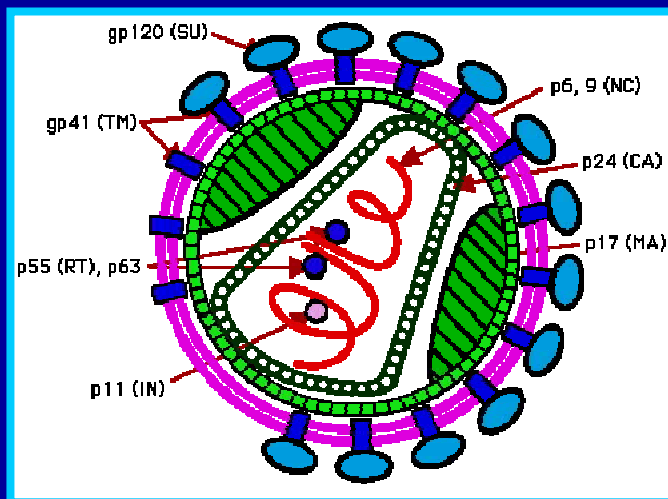
## \* Retrovirus

Fueron los pioneros en terapia genética *ex vivo* cultivos celulares

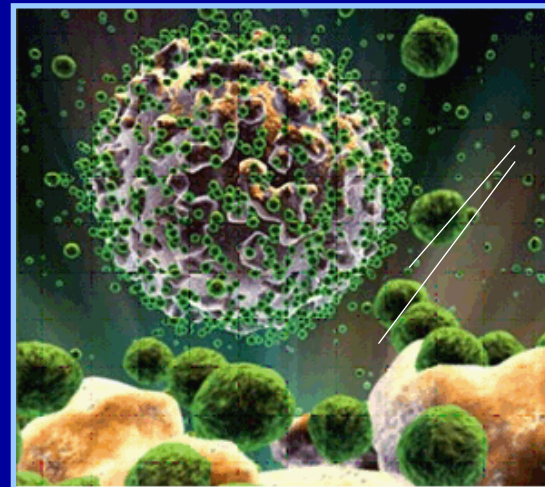
**Tira de ARN** que se revierte a doble banda de ADN que se integra al genoma del huésped

Pueden llevar 10kb de ADN extraño

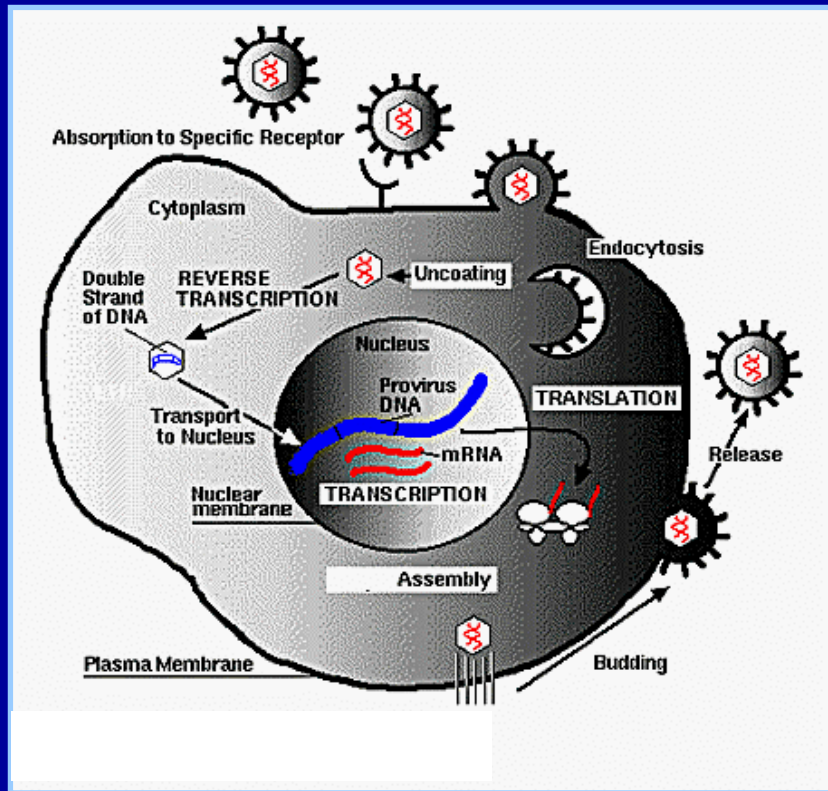
No hay ensayos clínicos con lentivirus (HIV)



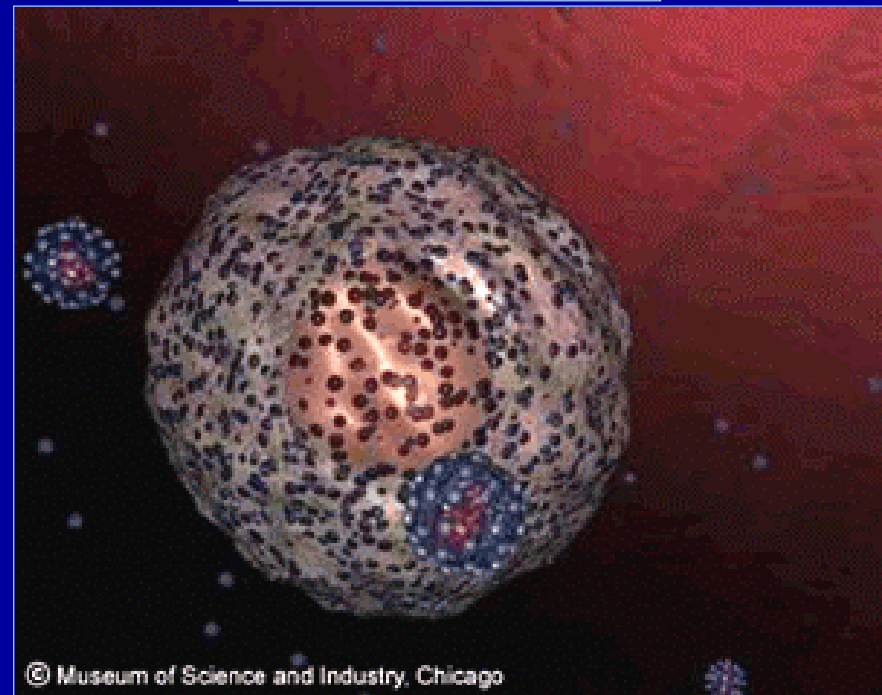
HIV



# Ciclo vital HIV



Linfocito T  
Helper infectado



# Retrovirus

## Ventajas

Integración genómica estable  
Eficaz traducción  
Expresión persistente  
No respuesta inmune

## Desventajas

- ° Sólo en células en división
- ° Posible mutación insercional
- ° Posibilidad de formación del virus replicación competente
- ° Posible recombinación con retrovirus endógenos humanos

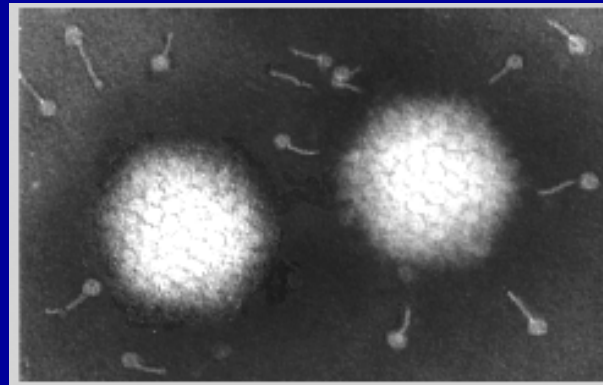
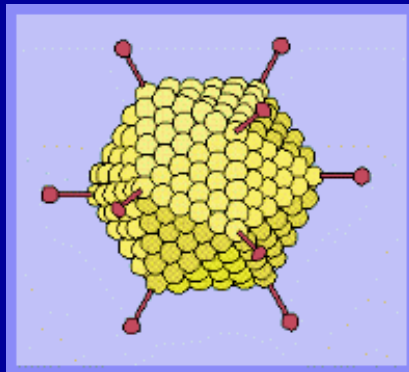
## \* Adenovirus

**Doble banda de ADN** sin cubierta,  
**Deficientes en replicación** requieren sistema  
de complementación celular (HEK)

No hay integración al genoma del huésped

Expresan proteínas virales que son  
**inmunogénicas**

Puede llevar 20kb de ADN extraño





# Adenovirus

## Ventajas

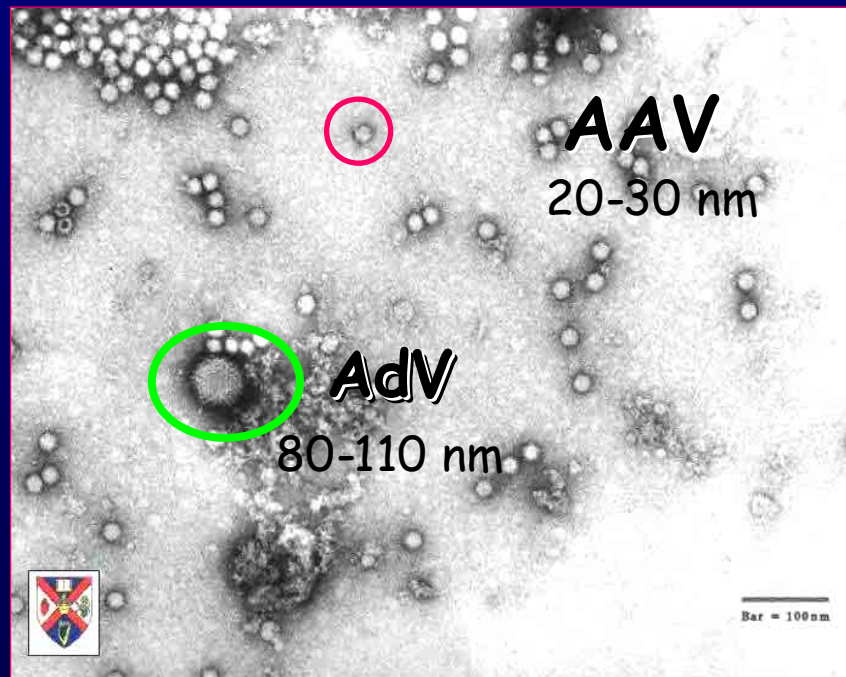
- ° Células en reposo o replicación
- ° Episomales
- ° Estables *in vivo*
- ° Títulos altos

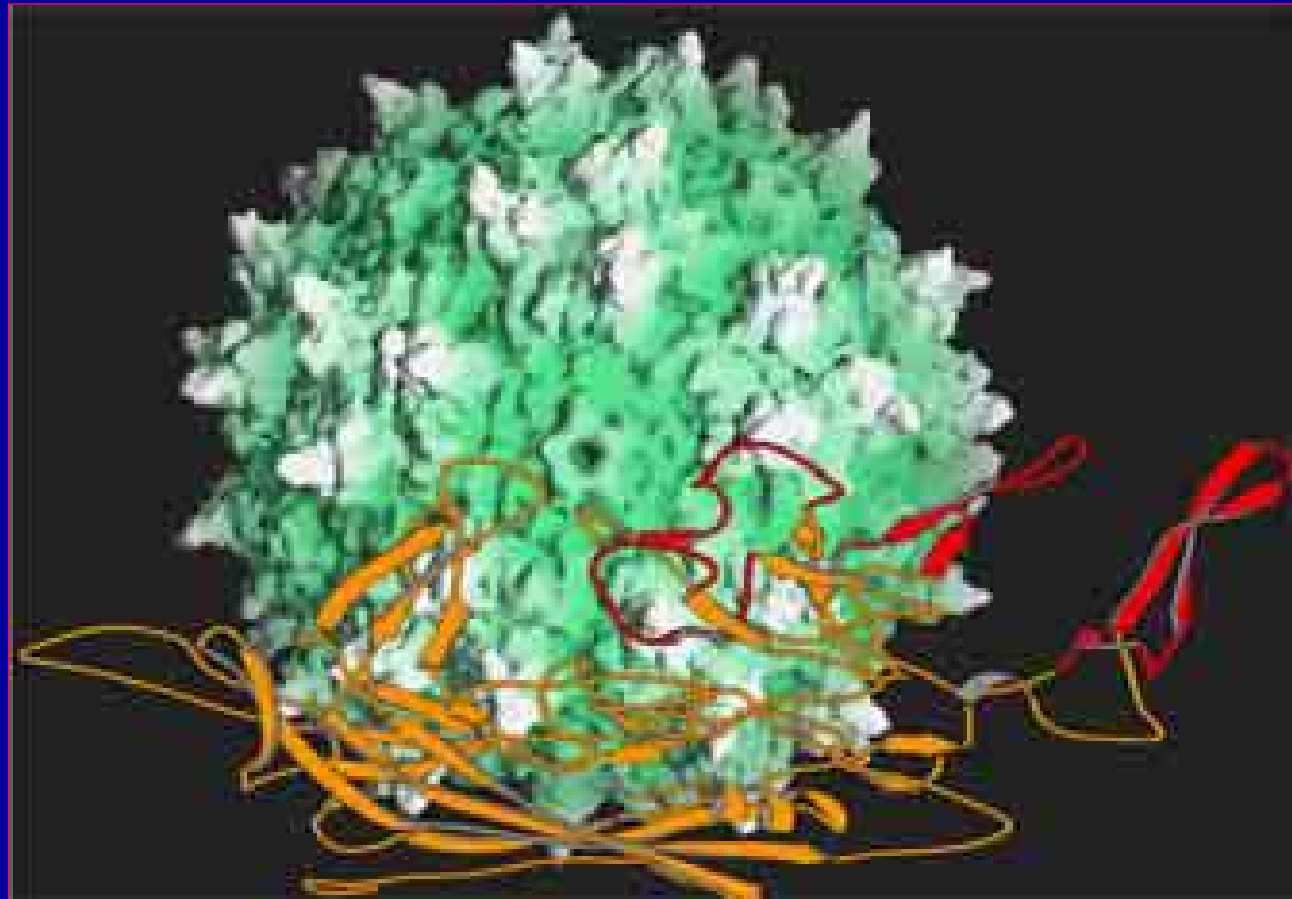
## Desventajas

- ° Respuesta inmune e inflamatoria
- ° Expresión transitoria
- ° Genoma complicado

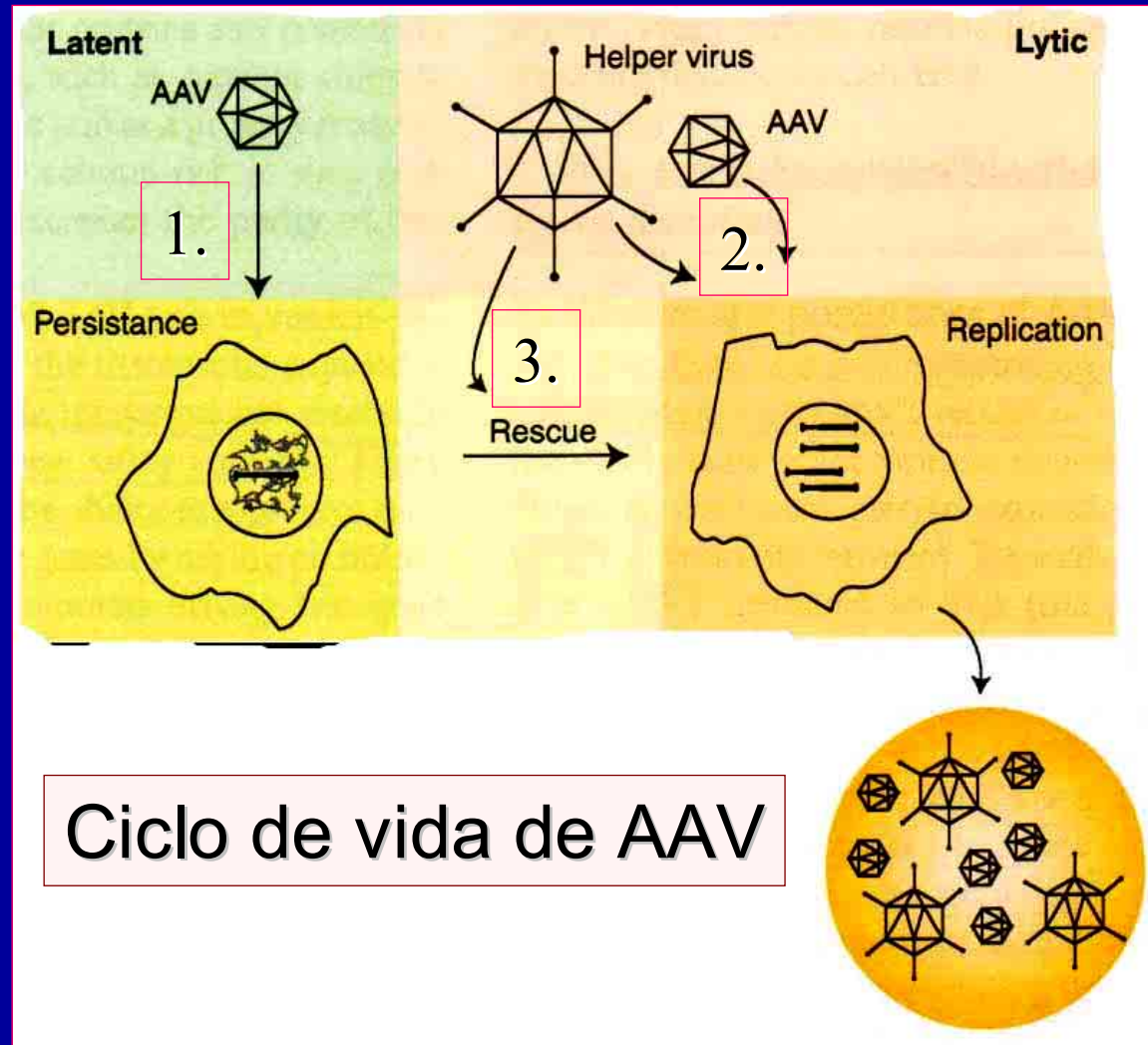
## \* Virus Adeno-asociados (AAV)

- Parvovirus helper-dependientes para replicación
- Infechan células **en reposo** y replicación
- **No es patogénico**
- Una banda de ADN con 2 genes *rep* y *cap* que se reemplazan por el transgen no mayor de 4.5kb



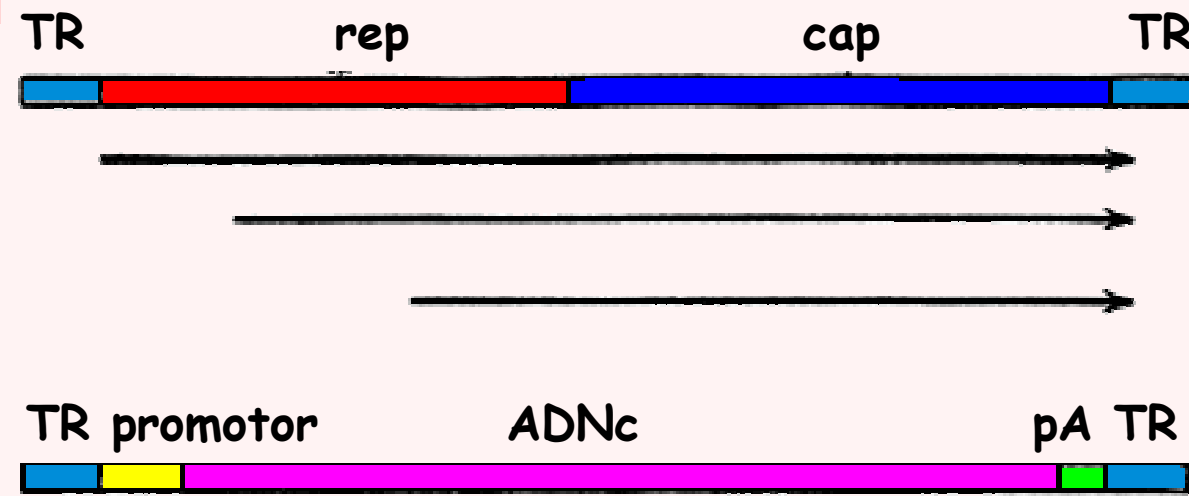


AAV estructura por cristalografía



Ciclo de vida de AAV

## Genoma Virus Adeno-Asociado

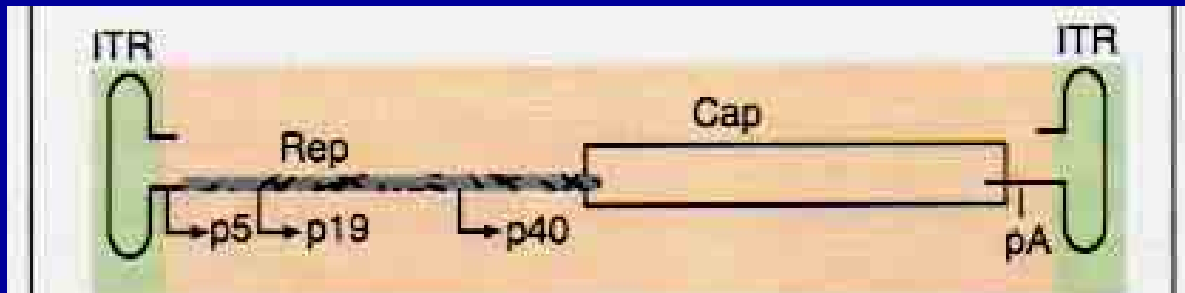


**Genes**

*rep*: replicación,  
expresión genética  
estructural e  
integración  
en el huésped

*cap*: proteínas  
estructurales  
capside

## Genoma AAV : una banda ADN 4680 nt



### Regiones codificadoras:

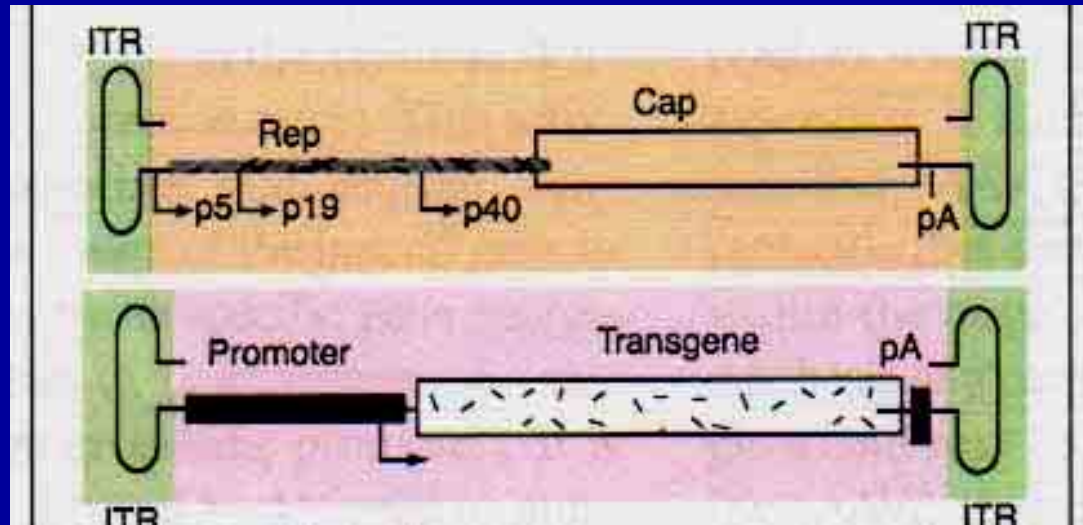
Un ORF codifica 4 proteínas **Rep**

Un ORF codifica 3 proteínas **Cap**

Regiones no codificadoras: 2 ITR 145 nt a cada lado

## Producción de rAAV

wt AAV



rAAV

96% del genoma del AAV no está presente en el rAAV vector !!

En el casete de expresión del transgen

NO HAY

regiones codificadoras  
para proteínas del virus wt AAV

ITR- TRANSGENE- ITR



## **Virus Adeno-Asociado**

### **Ventajas**

- ° Células en reposo o en replicación
- ° Títulos altos
- ° **Poco inmunogénicos**
- ° **No son patogénicos**

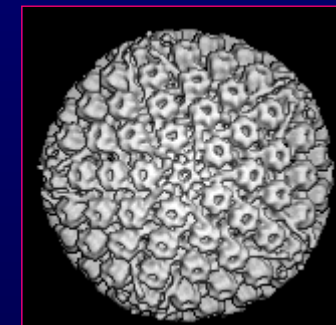
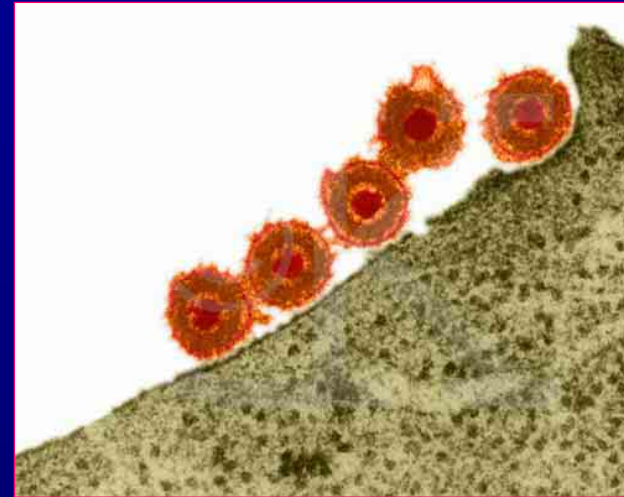
### **Desventajas**

- ° Transgenes pequeños < 4kb
- ° Posible mutación insercional por carencia de integración específica

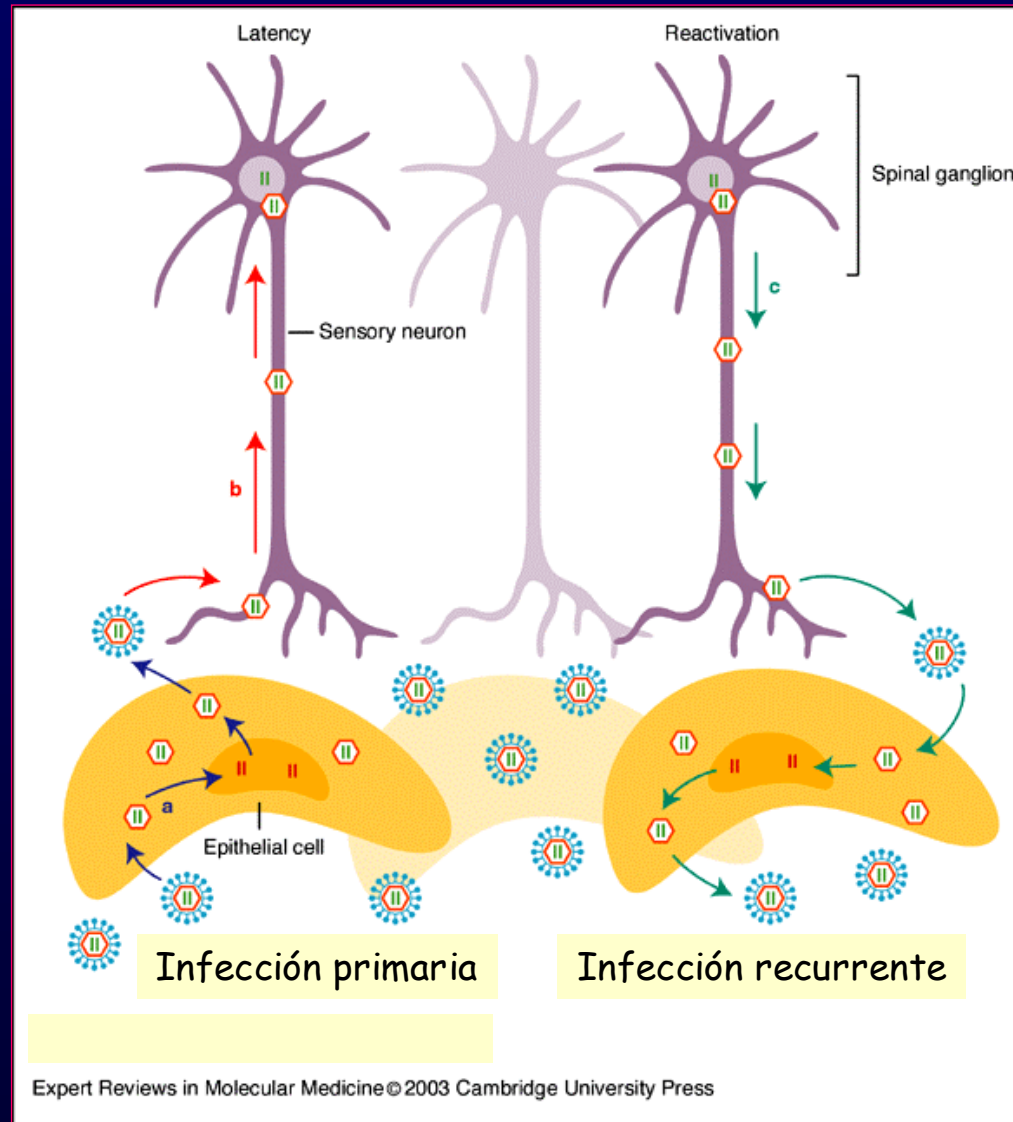
## \* Herpes Simplex 1

*Gr. herpein*: crónico, latente,  
recurrente

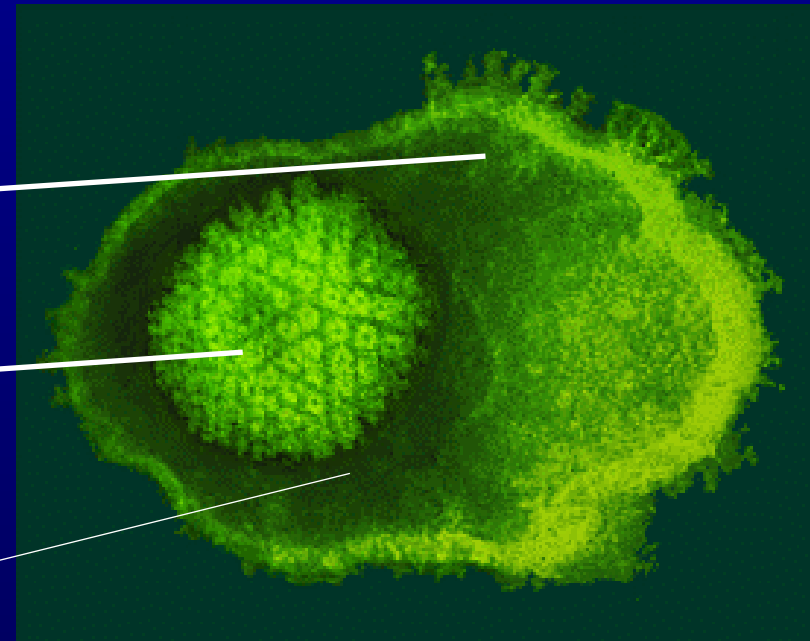
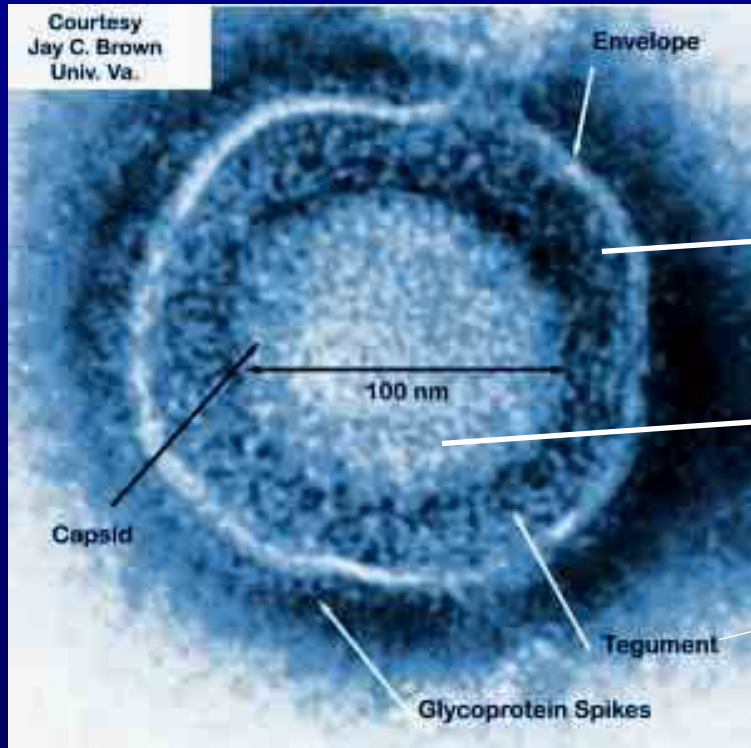
- Patogénico
- Neurotrópico
- Infecta células, ciclo dura 10  
hs termina en lisis celular  
o queda latente



# Ciclo vital Virus Herpes Simple



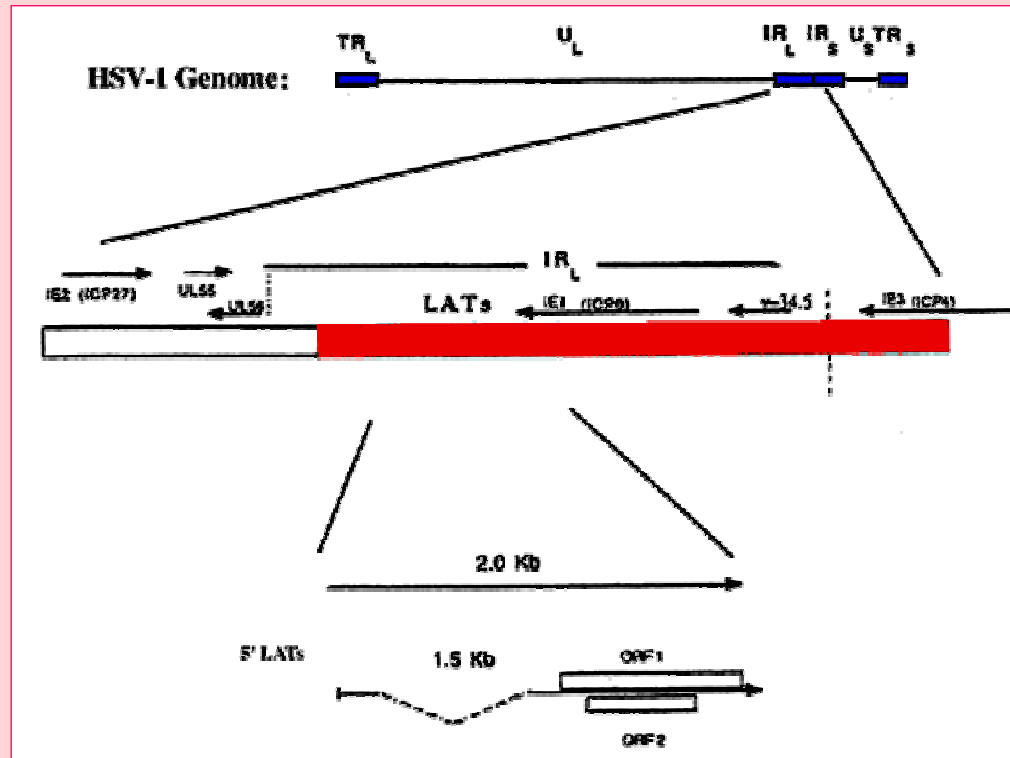
# \* Virus Herpes Simple 1



HSV con el envoltura rota

# Genoma Virus Herpes Simple 1

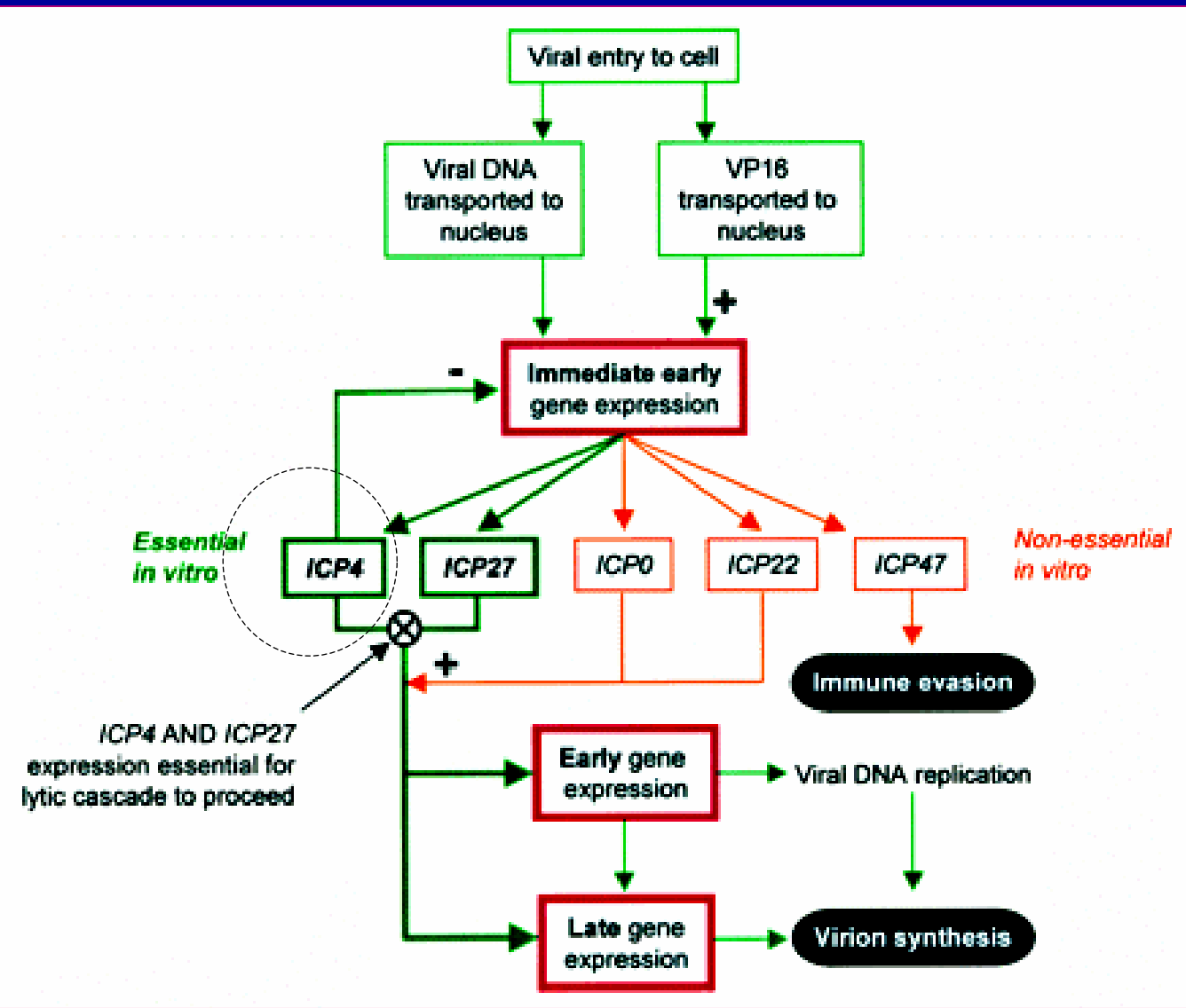
ADN doble  
banda lineal  
152Kb



Tiene **81 genes**, la mitad no esenciales que pueden reemplazarse por 40-50kb de genes extraños

## HSV1 tiene tres clases de GENES

1. **Alfa o tempranos inmediatos:**  
ICPO, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 que son factores trans-activantes que permiten producción de los
2. **Beta Tempranos** : codifican para metabolismo de nucleótidos y **replicación de ADN**
3. **Gamma Tardíos** : activados por los anteriores y codifican para proteínas estructurales que permiten la **síntesis del virion**



# **Virus Herpes Simple 1**

## **Ventajas**

- **Células en reposo**
- **Neurotropismo**
- Episomales
- Transgenes grandes

## **Desventajas**

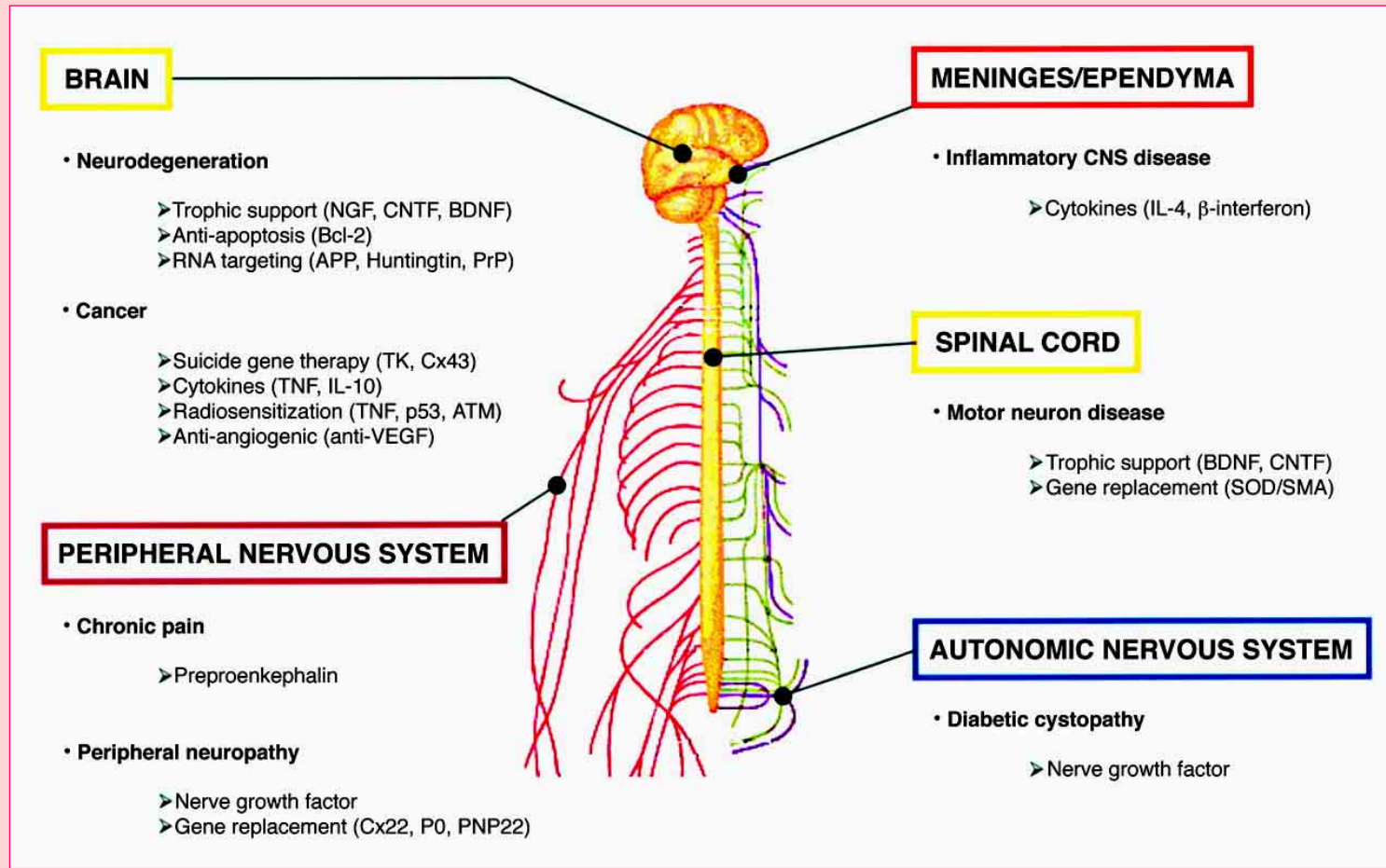
- **Patogénicos**
- **Inmunogénicos**



## USO DE VECTORES APROPIADOS

- \* Tropismo particular
- \* Extensión de la Expresión:  
local o difusa
- \* Intensidad de la Expresión
- \* Duración de la Expresión  
estable o transitoria

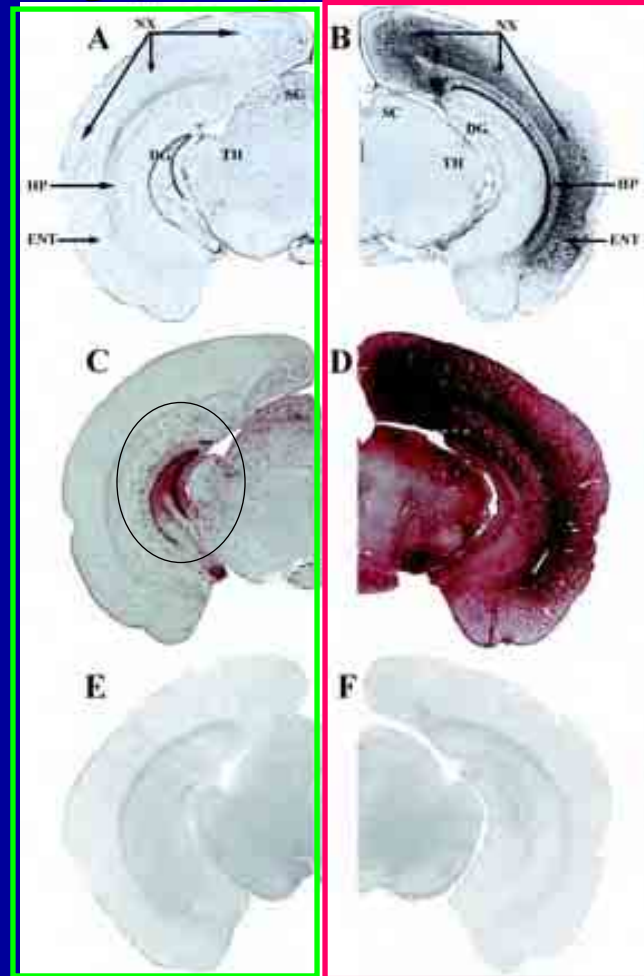
# Tropismo particular: Uso HSV vectores por su Neurotropismo



**EXTENSIÓN EXPRESIÓN**  
Diferentes SEROTIPOS

Modelo murino  
Mucopolysaccharidosis  
 $\beta$ -glucuronidasa  
deficiencia

**AAV2 vs. AAV1**  
**LOCAL DIFUSA**



hibridización In situ

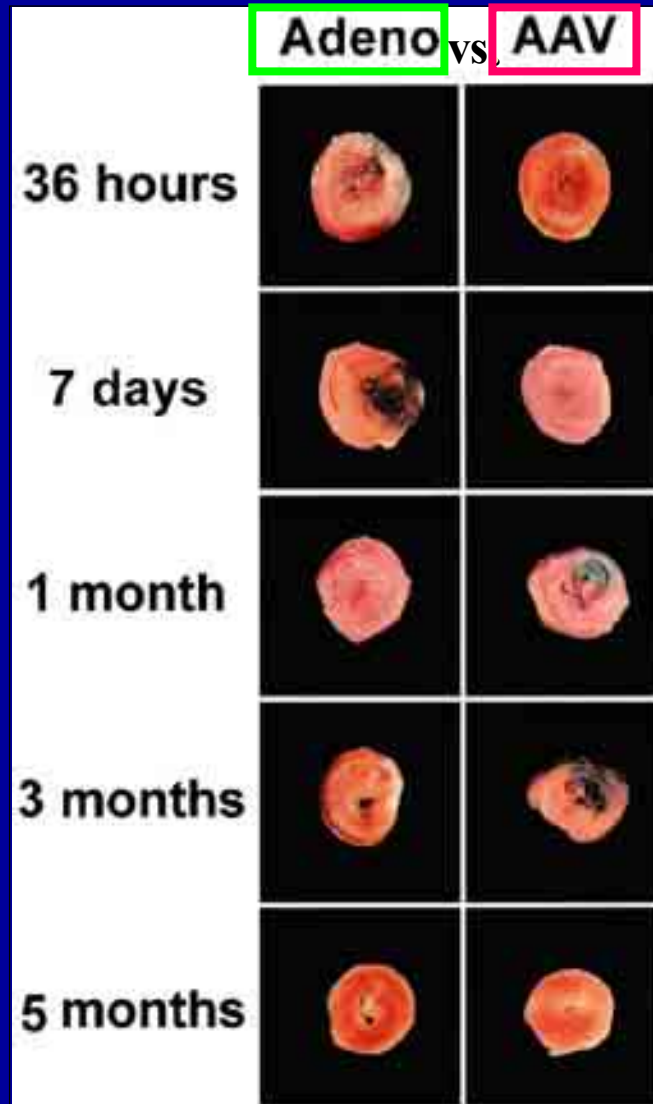
Antisuero contra  
la enzima humana

## DURACIÓN EXPRESIÓN Diferentes VIRUS

$\beta$  galactosidasa  
en corazones de ratas

### AdenoV

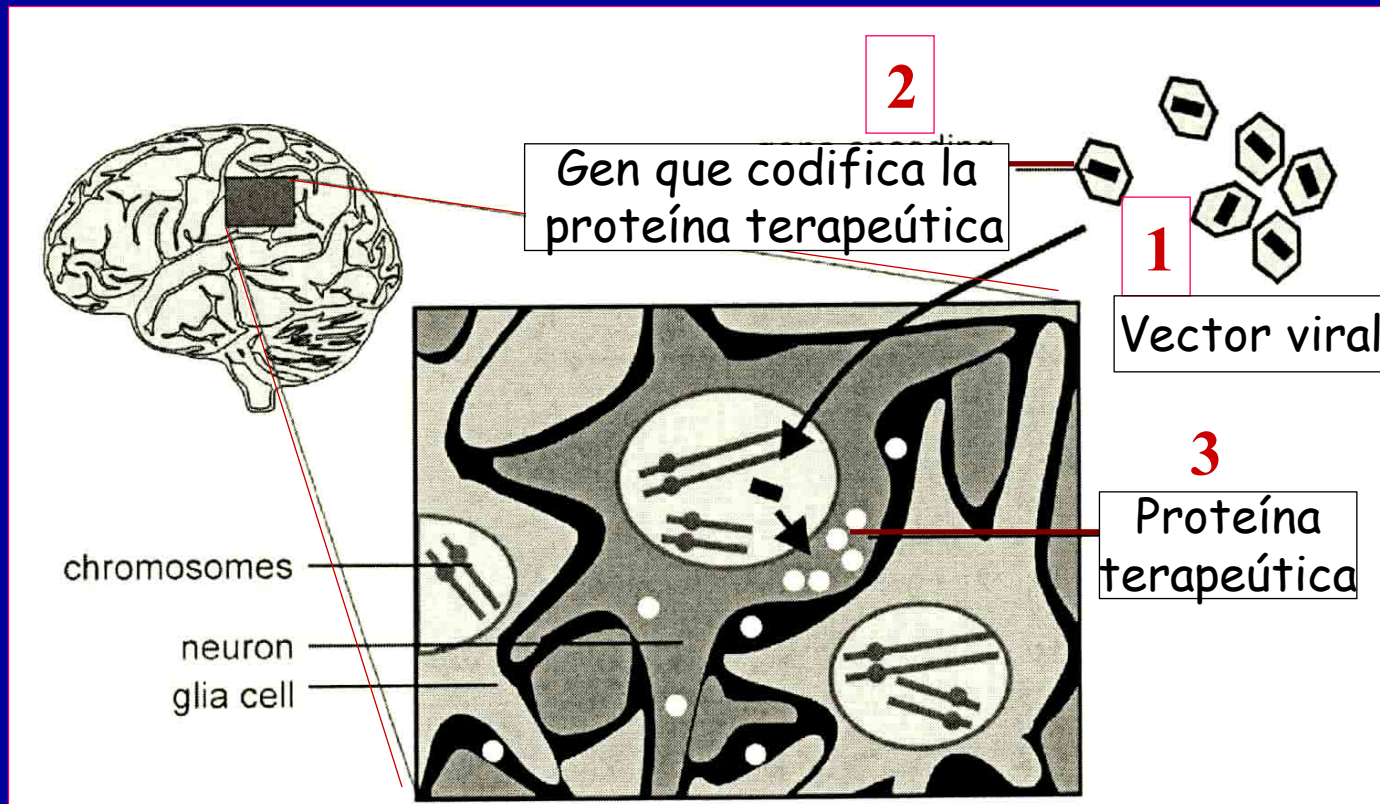
- \* expresión transitoria
- \* inflamación en el miocardio
- \* expresión en otros órganos



### AAV

- \* expresión estable
- \* no inflamación
- \* no expresión en otros tejidos

## TERAPIA GENÉTICA BASADA EN USO DE VECTORES VIRALES



TRANSGENES  
en  
VECTORES VIRALES

inyectados  
intracerebralmente

## INSERTO

Un fragmento de **ADN** colocado en un **vector** de clonación  
ADN de interés para estudiar y/o producir en cantidad

## TRANSGÉNICO

Organismo que tiene un pedazo de **ADN extraño** puesto en su genoma por técnicas de recombinación de ADN

APLICACIÓN DE SISTEMA rAAV  
-Enfermedad de CANAVAN-

- \* modelo animal
- \* ensayo clínico

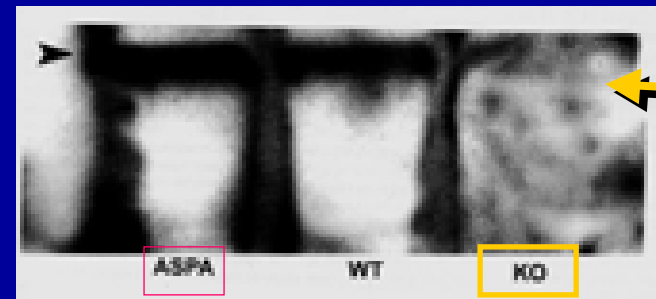
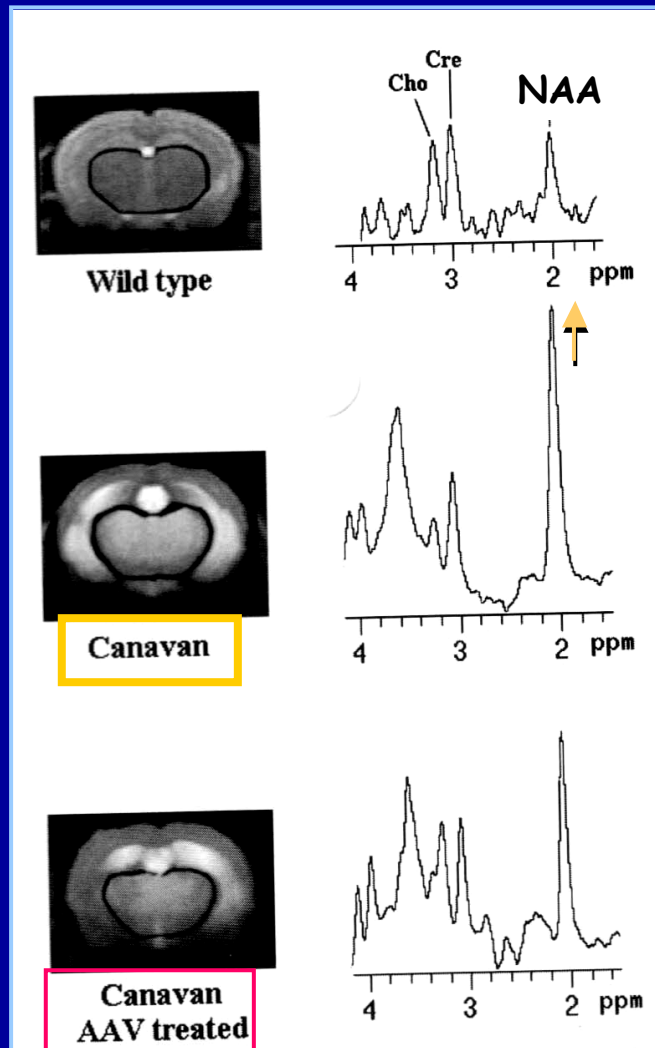


## ENFERMEDAD DE CANAVAN

- Es una rara condición heredada en la población judía Ashkenazi
- Ausencia de la enzima aspartoacilasa (ASPA)
- Acumulación de n-acetil aspartato (NAA) en el cerebro
- Daño de mielina, degeneración espongiiforme, retardo mental y muerte en la niñez

## Enf. Canavan modelo animal

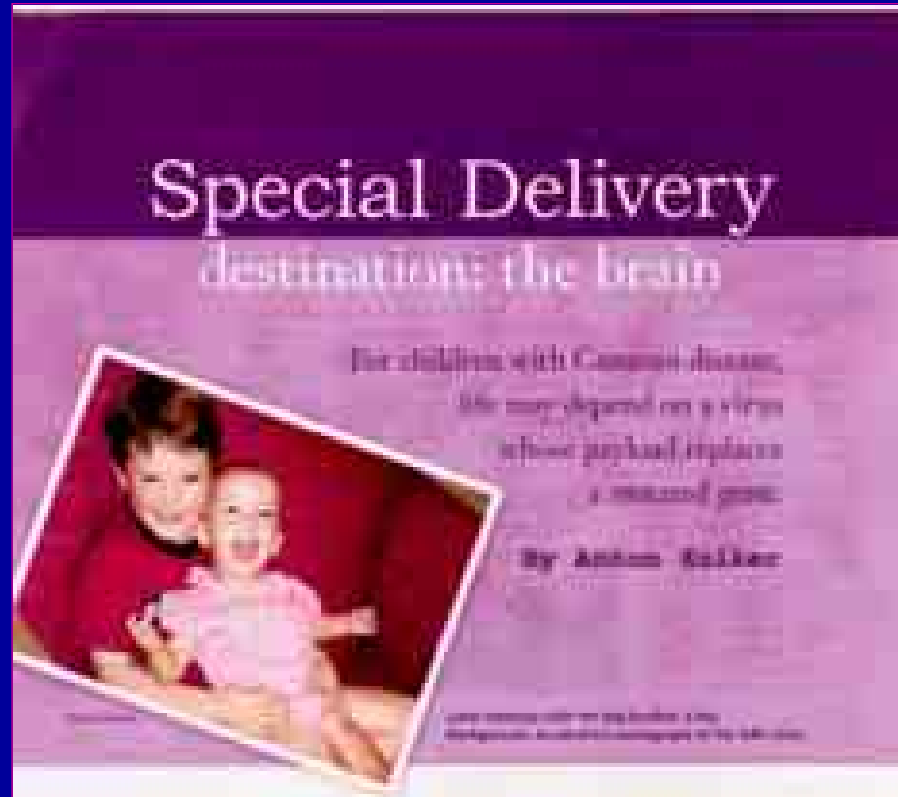
Terapia genética  
Administración de  
**rAAV-ASPA**



Detección de ASPA en el cerebro  
de ratón por Western blot

¿Paso siguiente?





Investigadores y terapeutas genéticos:  
J. Samulski N.C. , P. Leone P.A

## Enfermedad de Canavan Ensayo Clínico Fase I

Lana, niña de 2 años recibió en su cerebro :

$9 \times 10^{11}$  rAAV-ASPA /210  $\mu$ l

Unos meses más tarde se observó mejoría neurológica

Y esperanza para estos pacientes...

# Enfermedad de Canavan Ensayo Clínico Fase I



Paola Leone

Administración de  
rAAV-ASPA



Max 2001



Max 2003



# ¿QUÉ QUEREMOS HACER NOSOTROS?

## Aplicaciones preclínicas

- \* Usar genes que aumenten o disminuyan una determinada función en un área particular del cerebro de ratas
- \* Esos genes pueden ser para enzimas, receptores, canales, factores neurotróficos (NEUROPROTECCIÓN) etc.
- \* En los modelos animales de enfermedades neurodegenerativas puede ser para estudiar mecanismos etiopatogénicos o para inducir mejoría

## **Si tenemos,**

1. El transgen de interés insertado en el vector viral apropiado
2. El vector viral en cantidad suficiente como para lograr la expresión genética esperada

## **Entonces,**

Podremos administrar el transgen intracerebralmente simplemente **como una DROGA!**

# Tecnología de TRANSFERENCIA Genética

1. CONSTRUCCIÓN TRANSGENES DE INTERÉS  
(CASETE DE EXPRESIÓN)
2. PRODUCCIÓN VECTORES VIRALES



## 1. USA

Center of Neurovirology  
and Neurodegenerative Diseases,  
School of Medicine, University of Nebraska

**Preparación de rAAV- Modelos de Alzheimer en ratones**

## 2. Francia

Centre de Genetique Moleculaire et Cellulaire  
Faculté de Sciences, Université Claude Bernard

**Preparación de amplicones HSV1**

Vectores derivados del Virus Adeno-  
Asociado serotipo 2A

**Tsuneya Ikezu**  
**Center of Neurovirology and Neurodegenerative Diseases**  
University of Nebraska  
Omaha USA



Durham Research Center  
University of Nebraska



Grupo T. Ikezu

## Vectores derivados de VIRUS ADENO-ASOCIADOS

\* Recombinantes AAV  
(rAAV)

## ADN RECOMBINANTE

ADN de dos o más orígenes diferentes que ha sido clivado por enzimas de restricción y unido por ligasas

**CLONAR:** hacer copias de algo

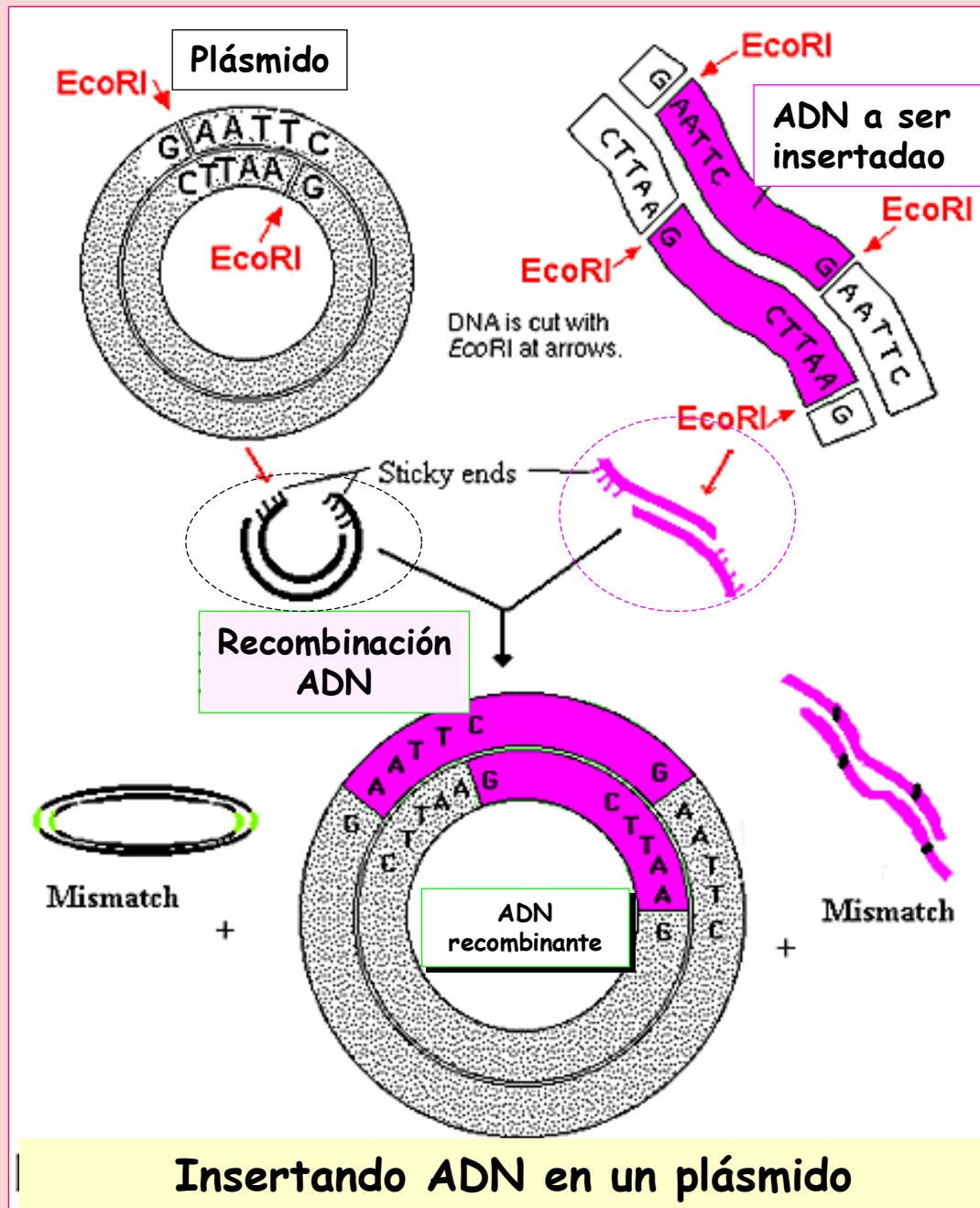
**CLONA:** la bacteria que lleva el plásmido clonado, o el mismo ADN clonado (inserto)

## PLÁSMIDO

Pequeño pedazo de ADN que se **replica** independientemente y que puede ser **transferido** de un organismo a otro

Pueden ser incorporados al genoma del huésped o no

Algunos contruidos artificialmente se usan como **vectores de clonación**



## VECTORES DE CLONACIÓN

Una molécula de **ADN** de un virus **dentro** de la cual **otro fragmento de ADN** de tamaño apropiado puede ser **integrado** sin perderse la capacidad del vector de autoreplicarse

Los **vectores** son con frecuencia moléculas recombinantes que tienen secuencias de **ADN** de diferentes orígenes



## Producción de rAAV

1. **Introducir plásmidos** en células humanas (HEK 293)

1. casete de expresión del transgene
2. plásmido con genes del helper
3. AAV Rep-Cap pero no ITR

(2 y 3 pueden estar en un mismo plásmido)

2. **Recolectar** el vector viral de las células infectadas

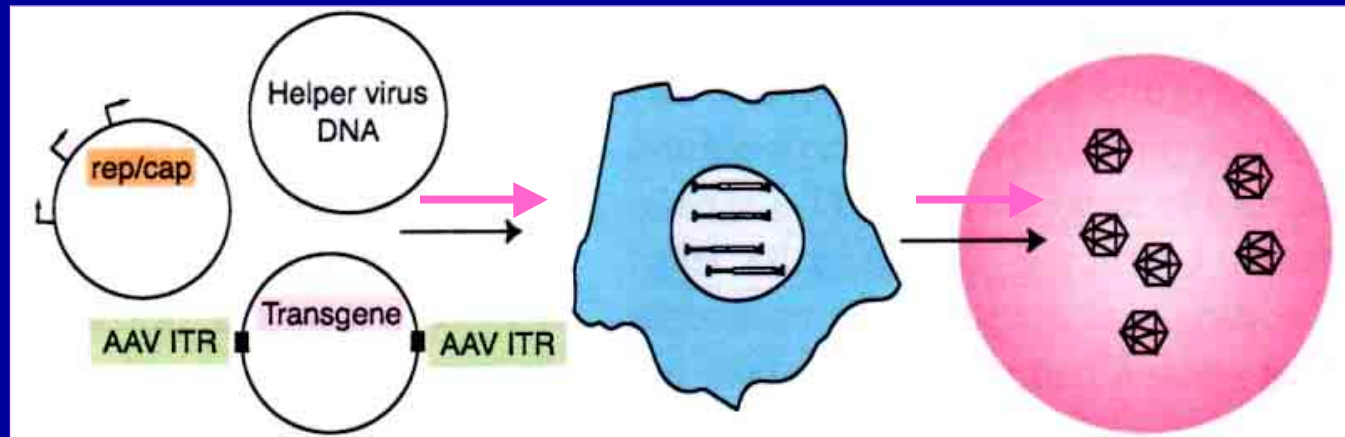
3. **Purificar y concentrar** el virus recombinante (rAAV)

## Producción de rAAV

Plásmidos

células humanas

rAAV



Nuevos protocolos han eliminado el uso de adenovirus como helper y así cualquier contaminación viral de tipo wt

## Preparation of rAAV-GDNF

### 1. AAV-GDNF clone construction

Digestion of pcDNA3.1/Zeo(+)-GDNF

Digestion of pAAV-MCS

Ligation of GDNF gene and pAAV vector

Transformation in E. Coli

### 2. Amplification of pAAV-GDNF clones

### 3. AAV-GDNF DNA extraction (maxiprep)

### 4. Transfection test in HEK cells (small plate)

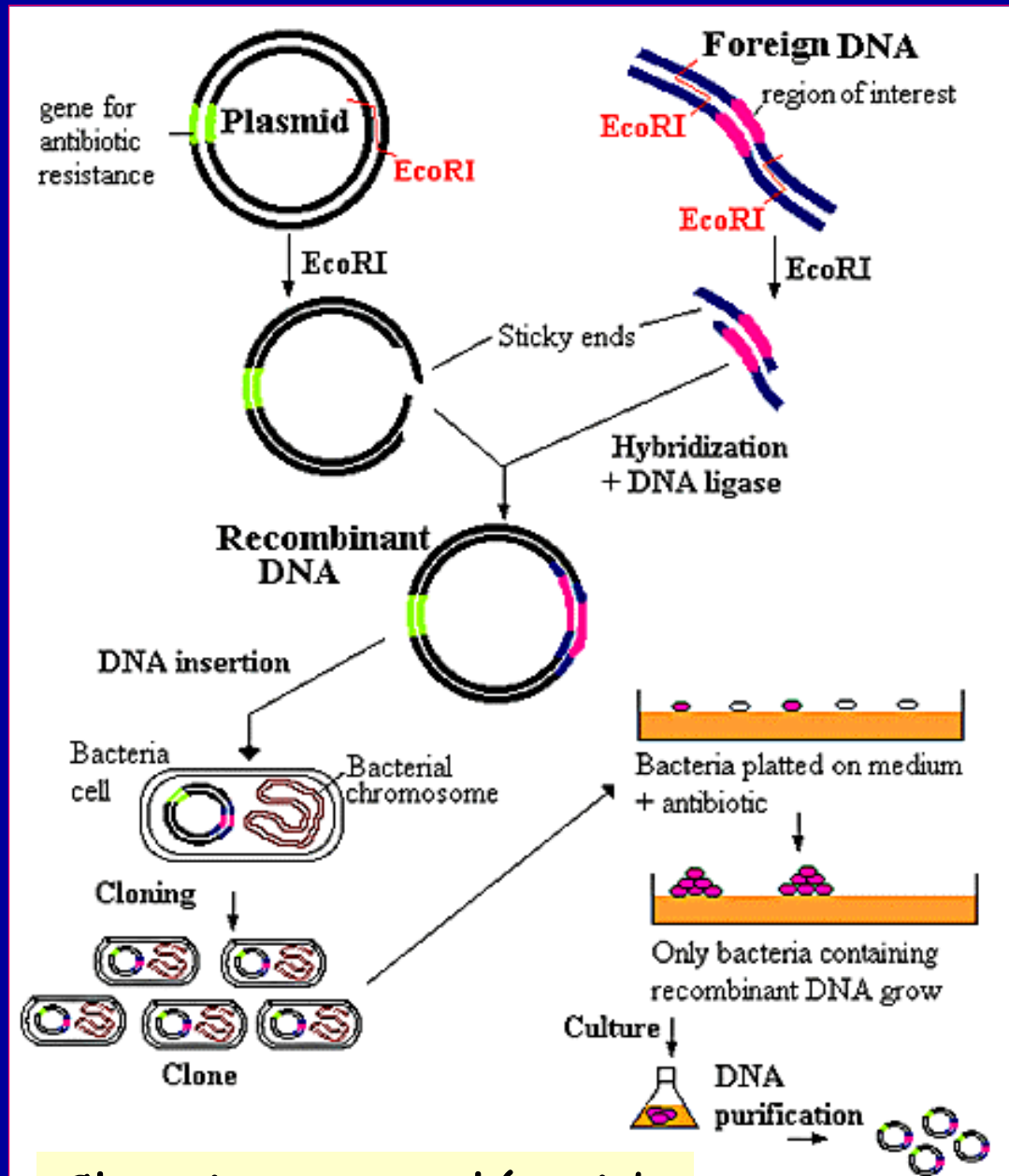
### 5. GDNF quantification by ELISA in culture media

### 6. Large transfection in 6 dishes HEK cells

### 7. Crude purification of rAAV-GDNF

### 8. Digestion and final purification VIRAPUR kit

### 9. DNA precipitation and quantification by RT-PCR

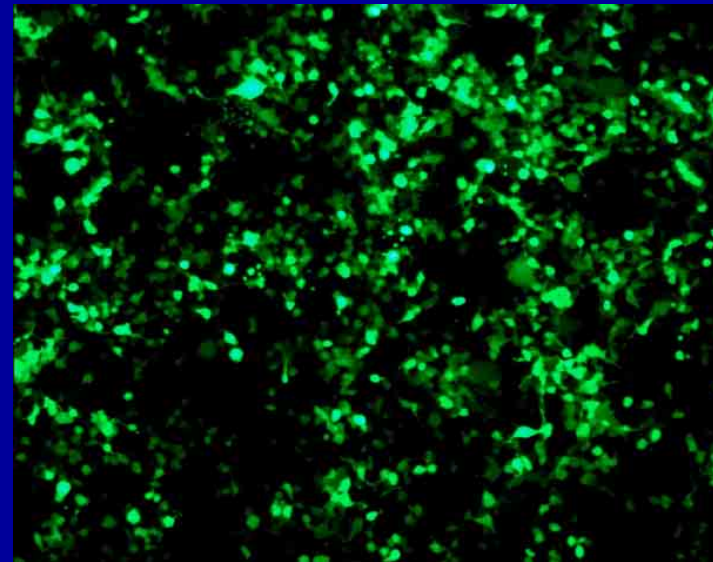


Clonaje en un plásmido

# Test de transfección AAV-GDNF en células HEK (Platos de 6 celdas)

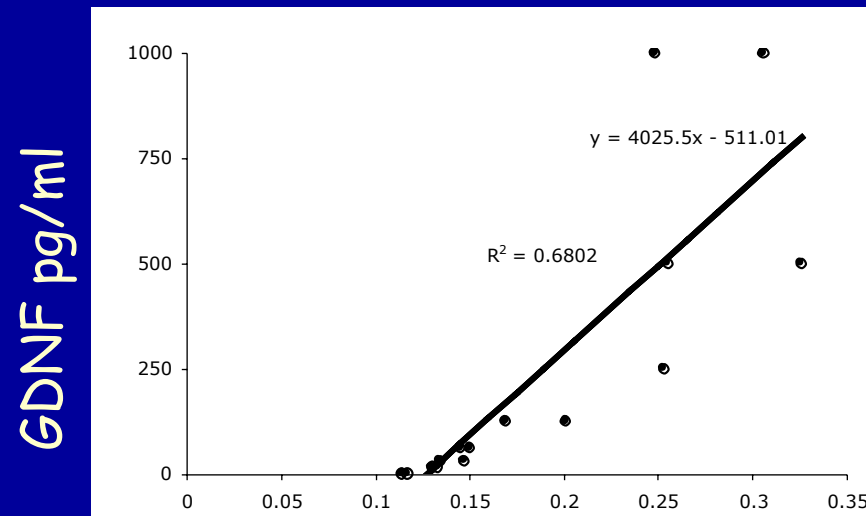


Control



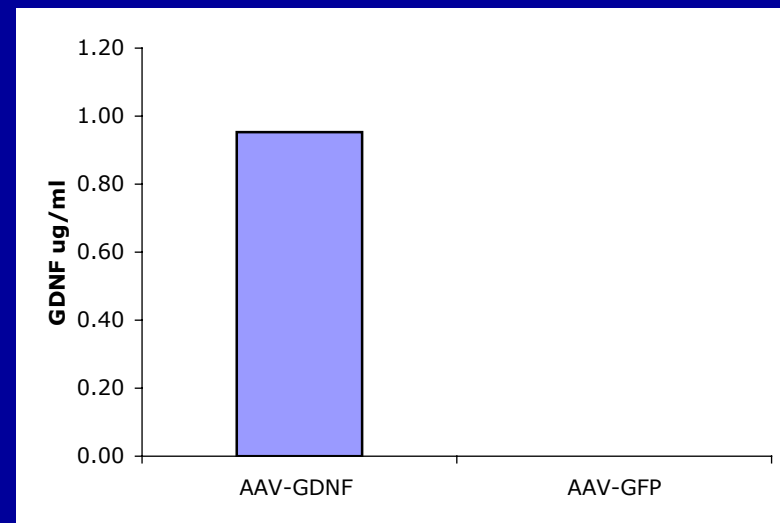
Transfección AAV-GFP

## CURVA ESTÁNDAR GDNF



Lecturas

Medición de GDNF por ELISA en medio de cultivo células HEK

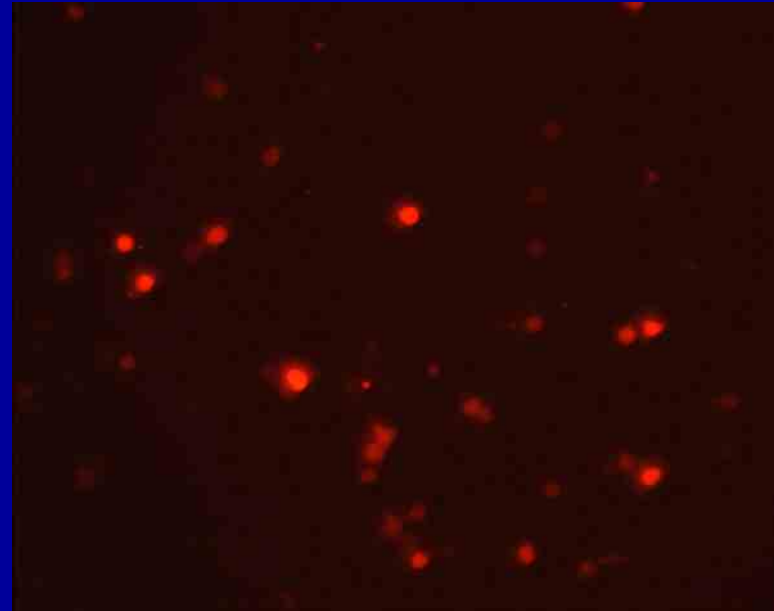


CNND 2004 XP

# Transfección grande AAV-GDNF 150 ml flasks (6) células HEK



Recolección células y medio  
Purificación cruda  
Digestión y purificación (Virapur Kit)



Fluorescencia roja  
pDF2 helper

CNND 2004 XP

# GDNF GEL SILVER STAINING

- 1 STD markers
- 2 STD markers
- 3 rAAV GDNF 1:10
- 4 rAAV GDNF 1:50



V1 735 aa  
V2 598 aa  
V3 533 aa  
Proteínas de la cápside

CNND 2004 XP



## Criteria para vectores a ser utilizados en transferencia genética *in vivo*

- \* Transduction en células post mitóticas como neuronas
- \* Expresión largo plazo
- \* No tóxicos no inmunogénicos

**rAAV** cumple todos los criterios

**\* Modelo de ALZHEIMER**  
(ratones TRANSGÉNICOS)

VECTOR: rAAV gen proteína tau  
mutada

GEN REPORTERO: GFP

BLANCO: HIPOCAMPO

Dr. T. Ikezu CNND (Omaha, USA)

# Modelo Murino de Enfermedad de Alzheimer

Transferencia genética al cerebro de ratones

Inyecciones bilaterales de rAAV serotipo 2

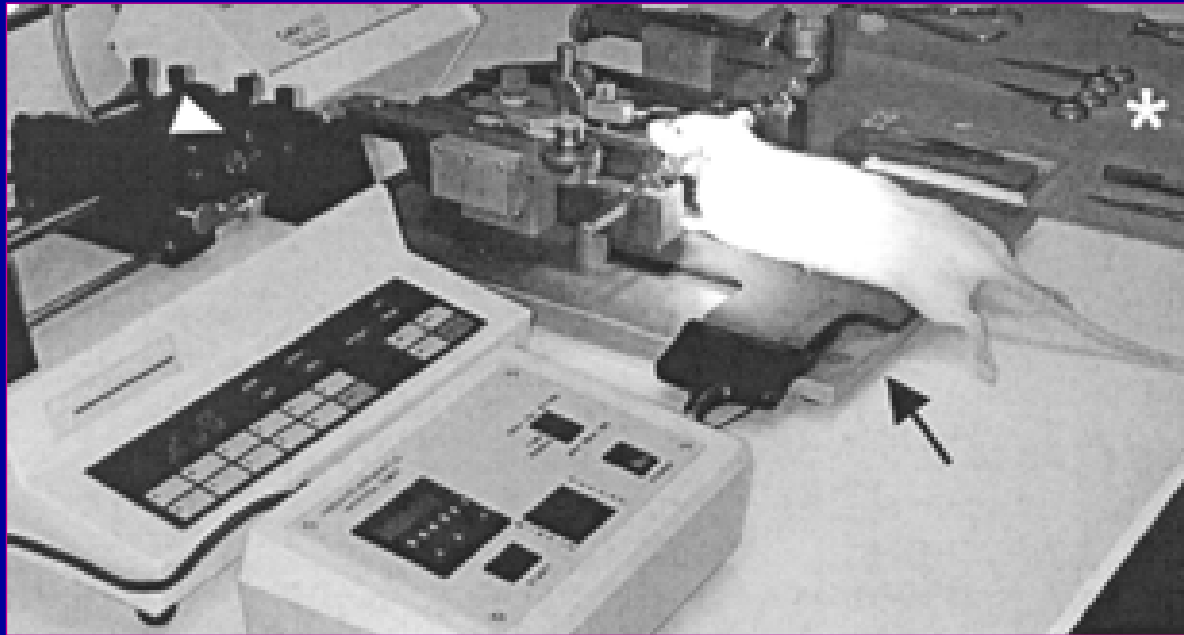
Blanco: hipocampo, *dentate gyrus*

Carga viral: 2  $\mu$ l of  $1 \times 10^8$  -  $10^{10}$  vp/ml

Grupos:

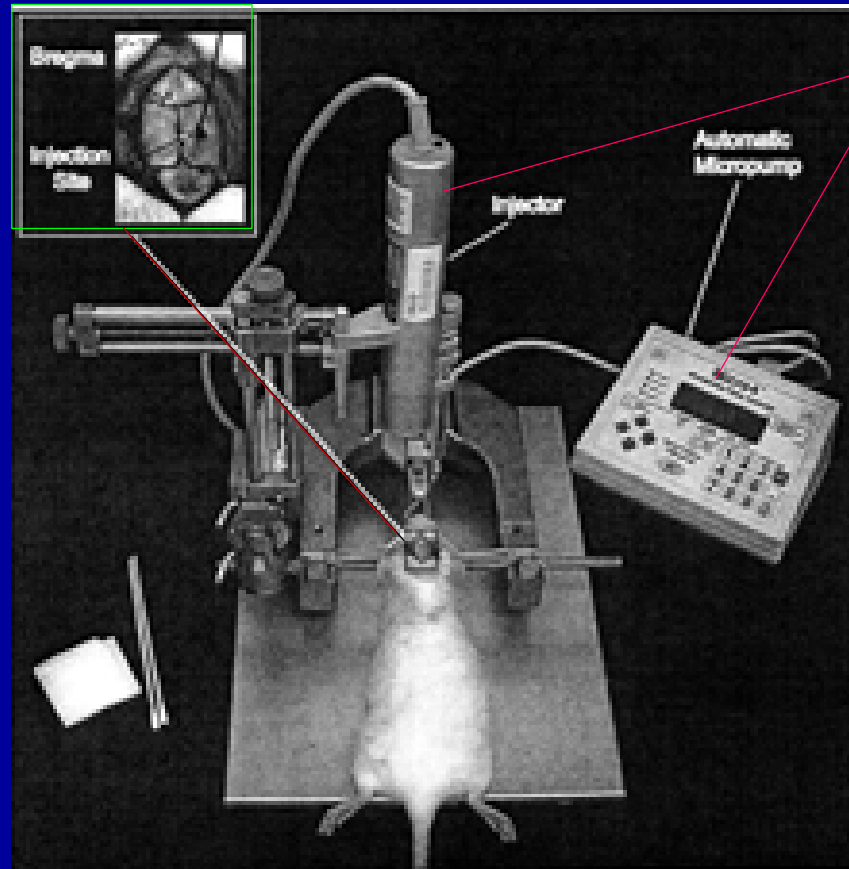
1. GFP, grupo control
2. BDKK (brain derived tau kinase) gen
3. tau mutada P301L gen
4. tau mutada y BDKK genes

# Administración intracerebral del transgen Método estereotáxico



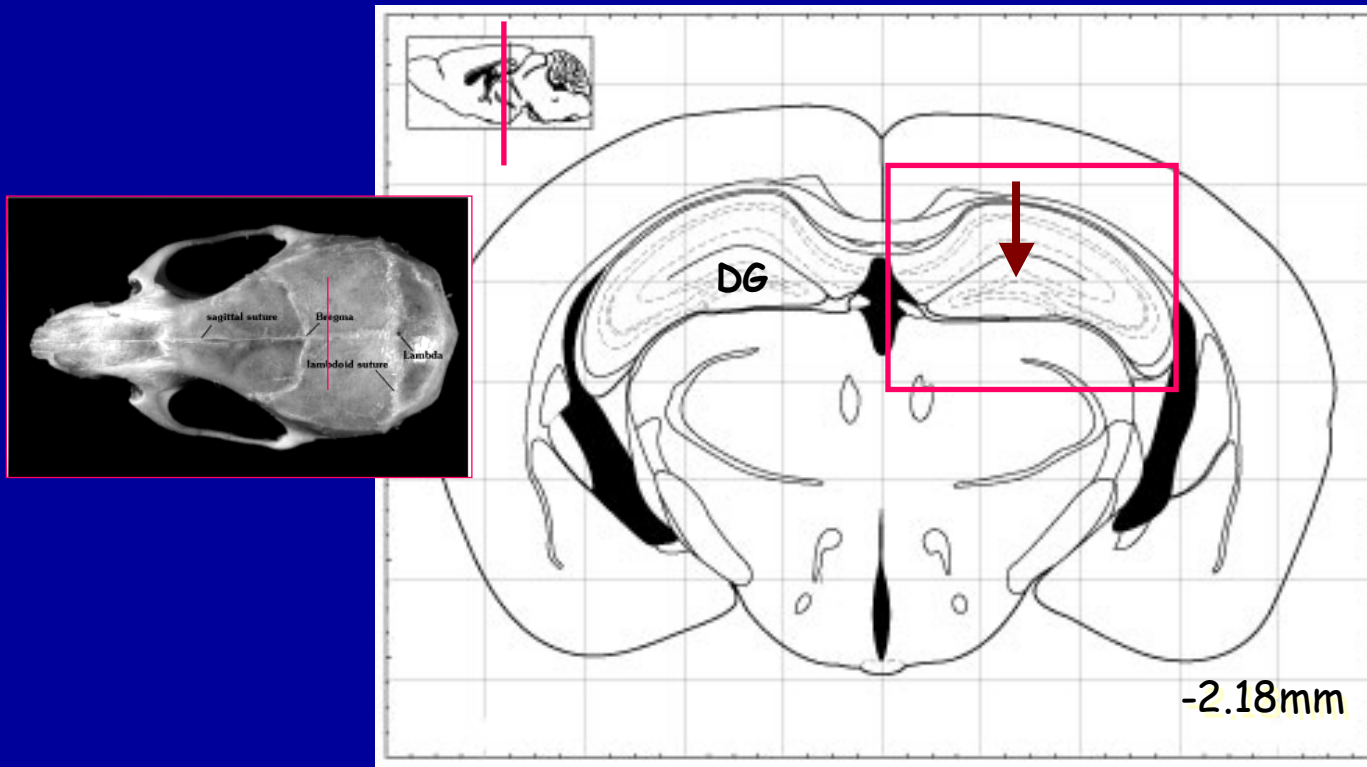
Animal anestesiado en apto. estereotáxico,  
bomba de infusión para inyección

# Administración intracerebral del transgen Método estereotáxico



Micro-BOMBA  
ADAPTADA AL  
ESTEREOTÁXICO

# Blanco: Hippocampus, dentate gyrus

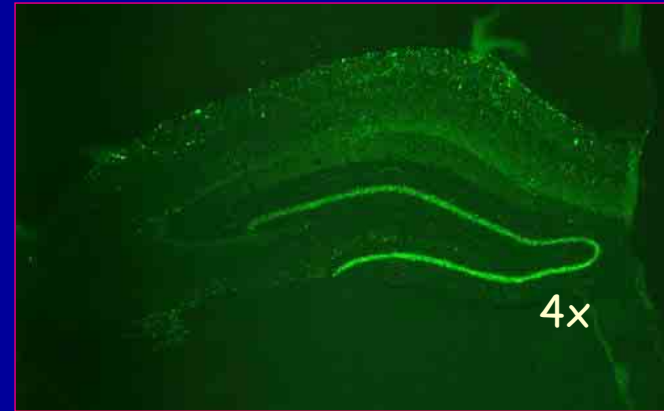


-2.1 mm detrás bregma  
1.4 mm de la línea media  
2.5 mm del cráneo

Paxinos & Watson Mice Brain Atlas Plate 49

## Resultados:

Transfección *in vivo*  
confirmada por  
GFP como gen reportero

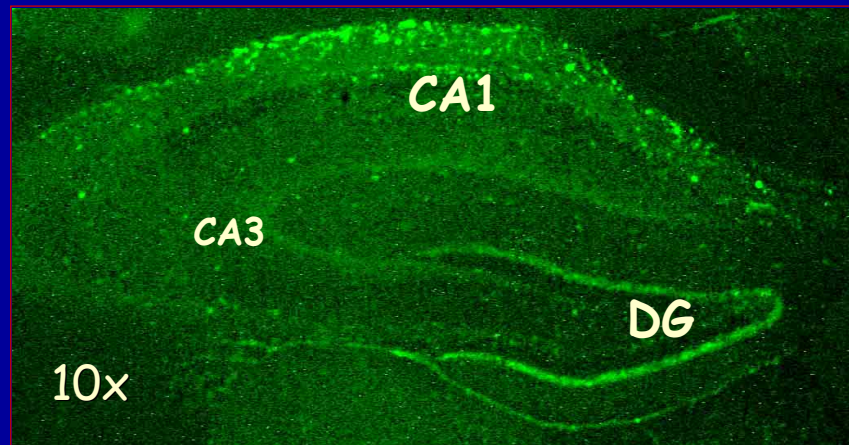


CNND XP 2004



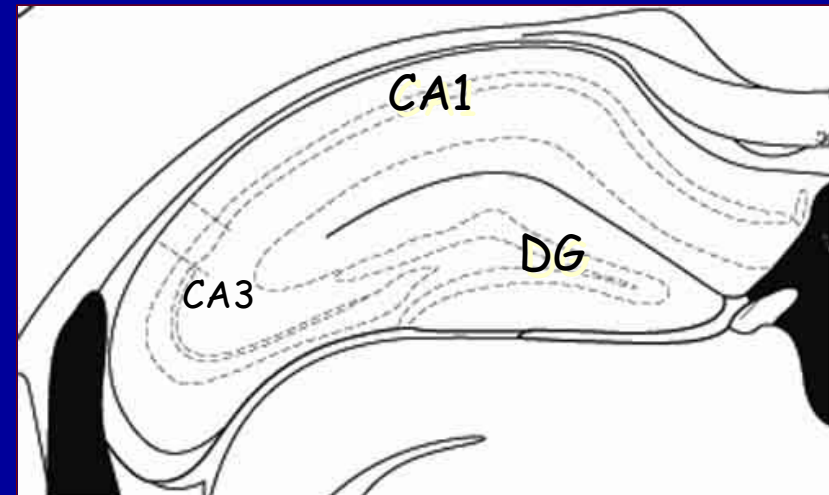
Fluorescencia nativa de GFP Hippocampus *Dentate Gyrus* 10x

## GFP fluorescencia nativa



2 ml  $1 \times 10^8$  rAAV-GFP  
viral particles  
Hippocampus Dentate Gyrus  
3 meses después de la inyección

## Hippocampus Dentate Gyrus

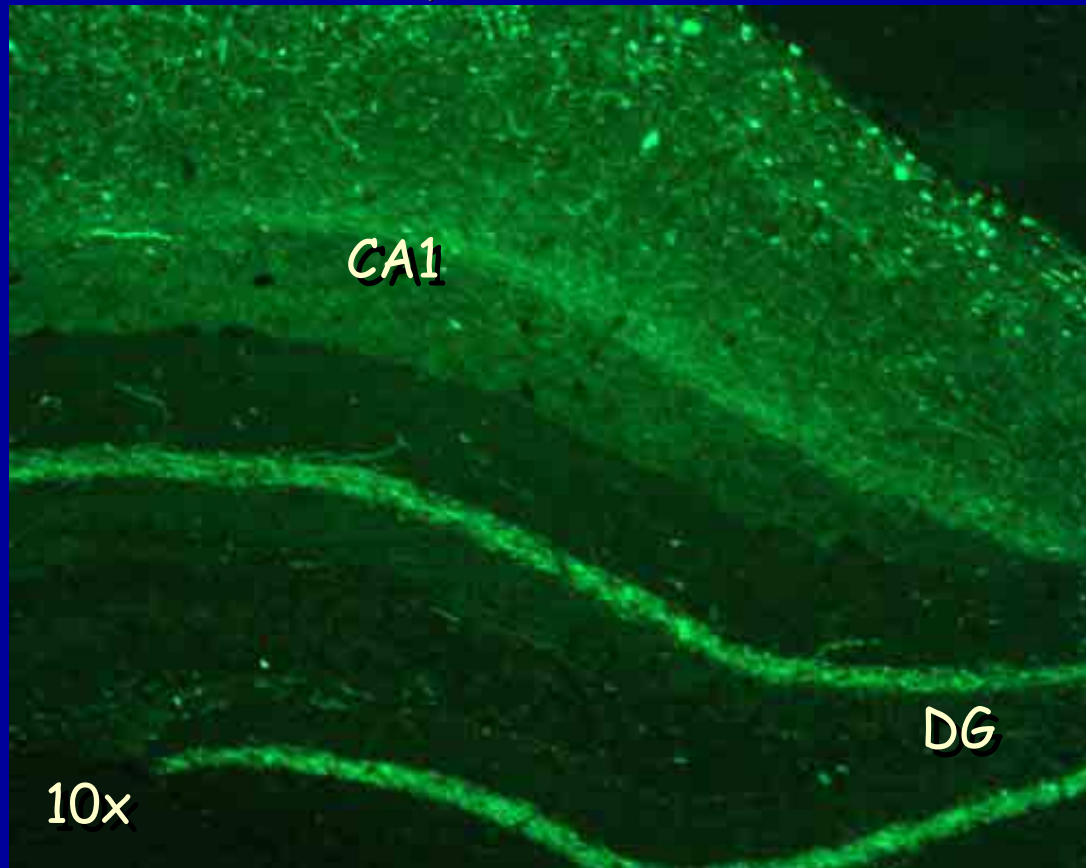


Paxinos & Watson's atlas  
Plate 49

CNND XP 2004



# Inmunofluorescencia GFP (anti-GFP policlonal)



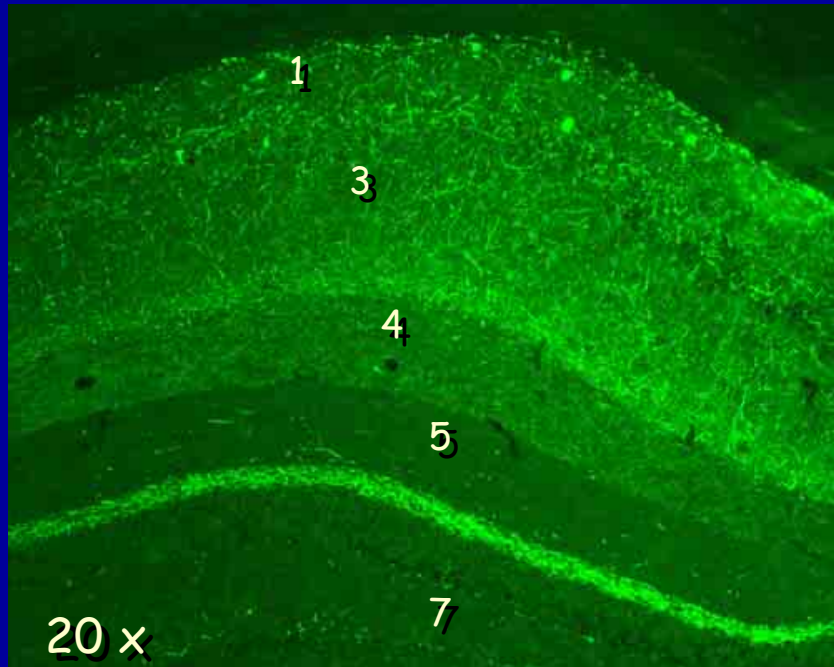
## Hipocampo

GFP fluorescencia en  
cuerpos celulares, axones y  
terminales

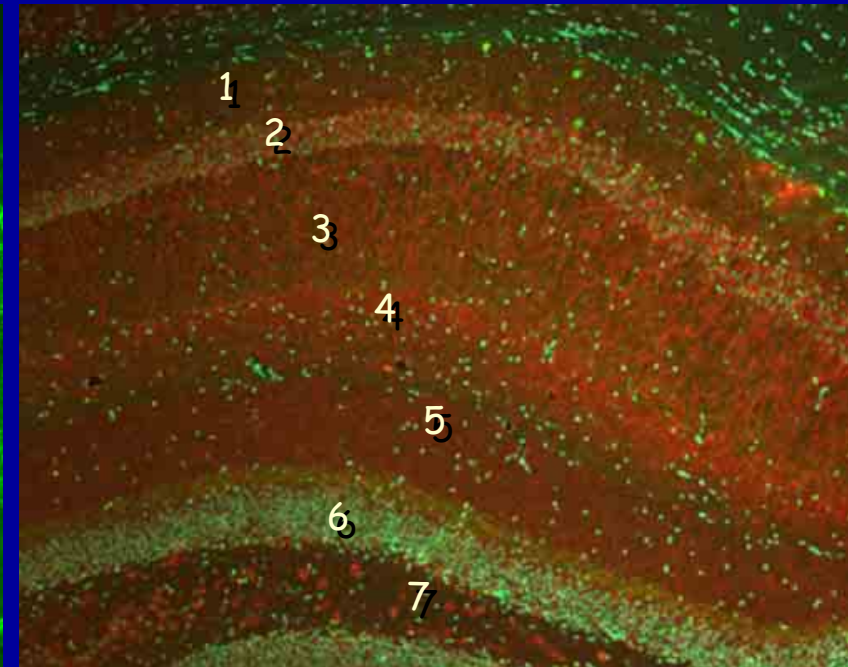
Útil para trazar vías  
axonales largas

CNND XP 2004

GFP



MAP2-Hoechts

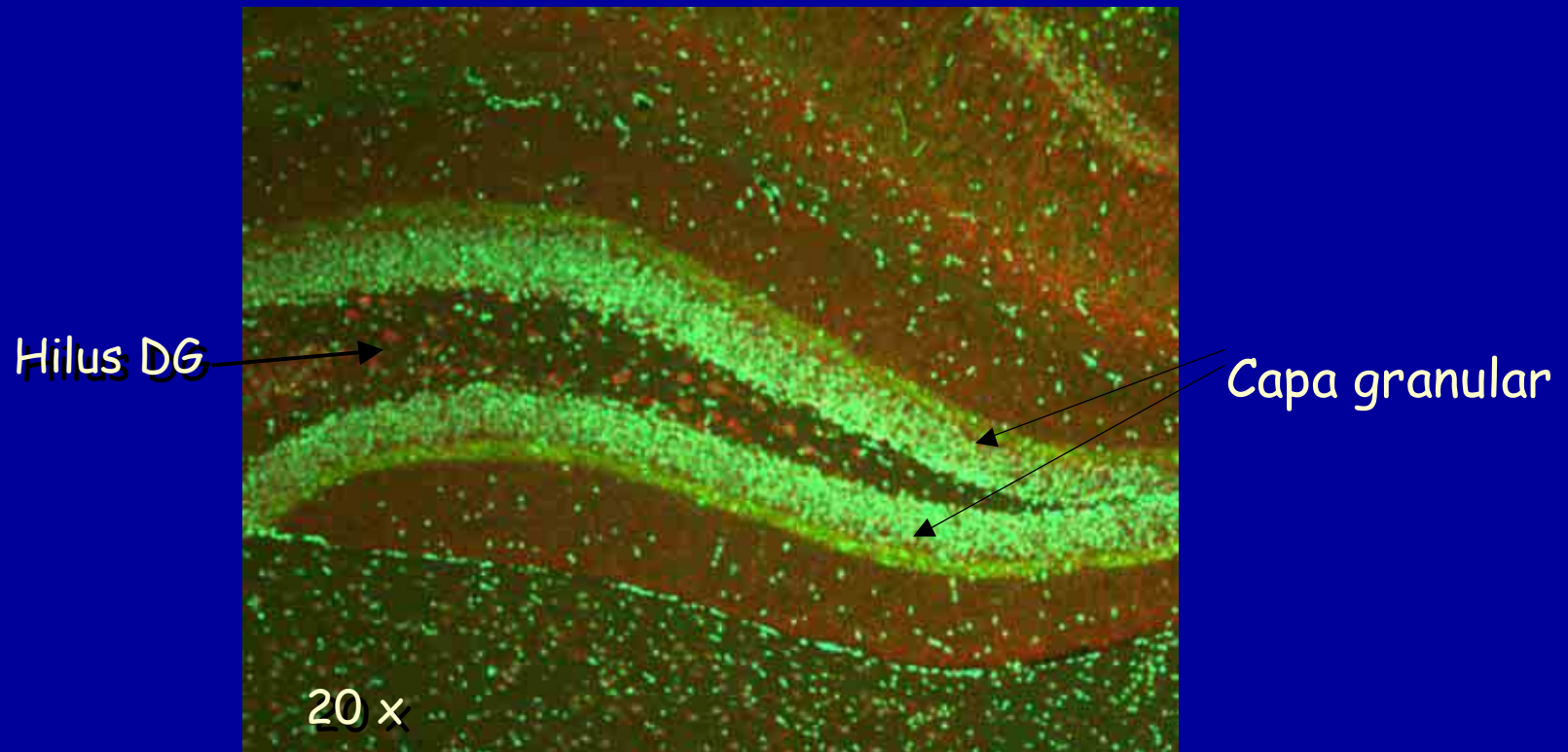


GFP-MAP2

- 1 Oriens layer of hippocampus
- 2 Pyramidal cells
- 3 Striatum radiatum of hippocampus
- 4 Molecular lacunar layer
- 5 Molecular layer
- 6 Granular layer
- 7 Polymorph layer

CNND XP 2004

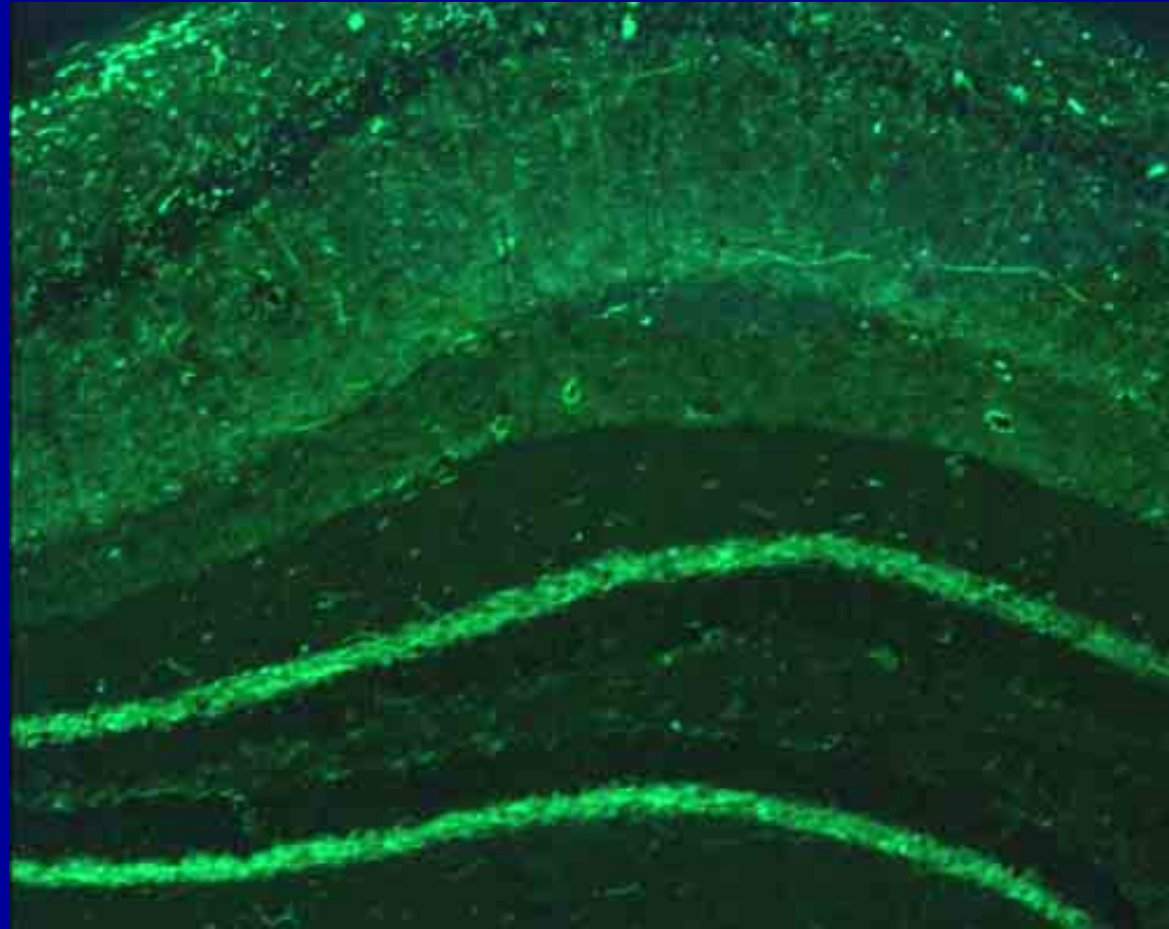
# Dentate gyrus



GFP, MAP2, Hechts

CNND XP 2004



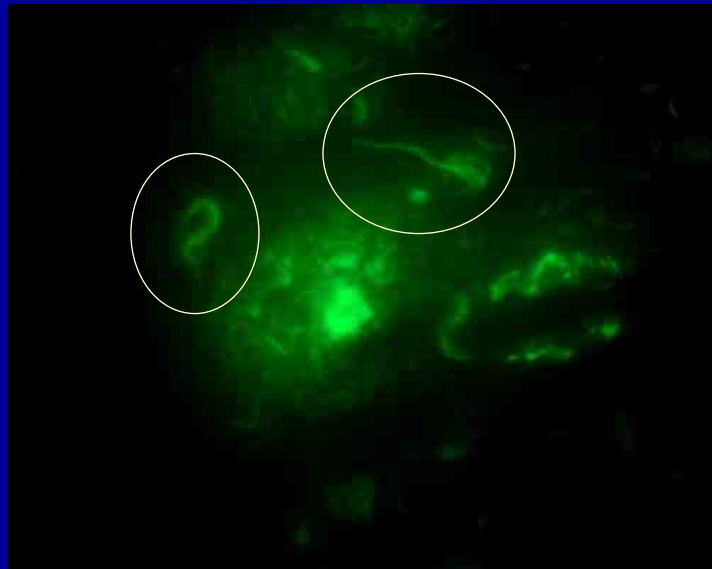


3 mo after 2  $\mu$ l rAAV-GFP  
CMV  
 $2 \times 10^5$  viral particles

CNND XP 2004

## RESULTADOS esperados

- \* Cambios de conducta 8-12 meses  
-tests conductuales-
- \* Cambios histopatológicos  
Desarrollo de NTF por tau mutada





**Continua...**