



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA**

**ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO  
DE LAS ALTERACIONES AUDITIVAS Y VISUALES DE LA  
MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IIIB**

**JENNIFER ANA PÉREZ CASTRO**



La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y el Dr. Albert Ribera Sánchez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG)

**JENNIFER ANA PÉREZ CASTRO**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**

**ALBERT RIBERA SÁNCHEZ**

**NOVIEMBRE 2020**

**BELLATERRA**



*A ti, Mamá,  
por todo, por siempre*

*Porque un mal comienzo  
nunca es definitivo*



Finalmente, ha llegado el día. El día en que un deseo pasa de ser un sueño a convertirse en una realidad. Hace 9 años que una inocente aspirante a científica salió de su casa en Canarias para venir a Barcelona a formarse y, desde entonces, toda esta etapa no ha dejado de sorprenderme y ponerme vivencias en el camino para seguir aprendiendo y creciendo; por lo que la convierte en la etapa más intensa de mi vida.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora, la Dra. Fàtima Bosch, la oportunidad de haberme aceptado como estudiante en su laboratorio para formarme y crecer como científica. Su empeño y dedicación me han aportado los conocimientos necesarios para comprender lo que cuesta vivir del mundo de la ciencia. Ha sido todo un orgullo haber formado parte de este ejemplar equipo de gran calidad humana y científica.

También agradecer a mi codirector, el Dr. Albert Ribera, todo su tiempo, sus conocimientos científicos, su paciencia en el laboratorio y su particular humor que han hecho de esta aventura una experiencia mucho más llevadera cuando se presentaban los obstáculos propios de la realización de una tesis doctoral en ciencias.

A continuación, me gustaría dirigirme al resto del equipo del CBATEG: ¡Muchísimas gracias! A todos los compañeros/as que están (**Tura, Sylvie, Sergio, Ivet, Rosmi**) o han estado (**Cristina**) en la 4ª planta. Al Dr. Jesús Ruberte por los consejos y correcciones en temas anatómicos. A **Miquel** y **Jordi** por sus profundos conocimientos informáticos que siempre me han sacado de un apuro. A mis “chicas del oeste” (*Western Girls*), **Alba** y **Laia** por ayudarme a solventar cualquier duda o problema (fuera del tema que fuera). También agradecerle a **Montse** todo el papeleo que nos gestiona para que todo vaya como la seda. A las chicas de la cocina, **Jenny** y **Lidia**, que siempre tienen todo a punto para que nunca falte de nada. **Marta Moya**, tus conocimientos en *inmunos* facilitan mucho el aprendizaje. A 2 nuevas incorporaciones: **Lore** y **Ángel**, gracias por todos los momentos compartidos. A los compañeros/as del despacho de post-docs de la 3ª planta: **María, Vero, Vicky**; gracias por haberme aconsejado o ayudado en algún momento de este camino. A todos mis “adorables cabroncetes”: **Gemma, Ignasi, Nia, Claudia, DaddyMan** (VSF); gracias por las risas, las vivencias y los ánimos cuando parecía que todo se ensombrecía. A **Marta**, aunque sea de reciente incorporación, tu gentileza hacen más amables los días. A mis “MPSerros”: **Carles, Sandra, Sara, Víctor, Albert** y, en especial, a **Joan** y **Xavi**: con ustedes dos inicié esta loca aventura desde el curso de animales y, desde entonces, han estado siempre a mi lado. Gracias, chicos, Wënnifer los quiere. También quiero hacer una mención especial a la Dra. MarisDa, “la loca” (**Marisa**). Gracias por aguantar mis aberraciones espetadas al aire cuando me



cabreo conmigo misma y tener siempre ese buen humor y bondad que te caracteriza. St<sup>a</sup>. Marisa de Todos los Perros. No cambies nunca, loca.

Al equipo de producción: **Xavi León**, **Meritxell**, **CharleStone** (C. Roca). Sin vosotros todo esto no sería posible.

Toca el turno de la familia. Es bien sabido que existe la familia de sangre y la que una hace con el tiempo y las vivencias. En primer lugar, agradecer a mi familia de Canarias todo el apoyo incondicional y la fuerza que me han aportado a lo largo de mi vida para que nunca me rinda en la lucha por mis sueños. A todos y cada uno de ellos: Gracias. A mi abuela Pino, por ser la madre que me crió. A mi padre y a mi hermano Kevin por ser apoyos incondicionales en la distancia y por guardarme lo mejor del Atlántico siempre que vuelvo a casa. A mi madre, la mujer que llevo por bandera como mi heroína y ejemplo a seguir. Siempre fuerte, siempre en la batalla. Te quiero, mamá.

Ahora, pasaremos a la familia catalana. Como me dijo una mujer muy sabia: "*Val més un veí a la porta, que un parent a Mallorca*". Y por ello, no tengo más que palabras de agradecimiento y cariño para toda la familia Piqué-Reig. Marta, tampoco me olvido de ti, siempre te incluyo en el pack.

Y ahora tú, Albert Piqué Reig, gracias. Apareciste de manera inesperada y te conocí en un entorno en el que jamás pensé verme: Castells! Eres una persona increíble: divertida, activa, amena, cariñosa, pero, sobre todo, paciente, amable y calmado; cualidades sin las que aguantarme (sobre todo en esta etapa) hubiera sido todo un reto. Gracias por estar siempre ahí y por hacer que la historia de *Calor y Carretera* esté siempre llena de sorpresas. Te quiero.

Otra parte de la familia que una construye se cimienta en las amistades de la juventud, es ahí donde aparecen ustedes, chicas. Muchas gracias por ser mi familia durante la época de Uni y seguir siéndolo con el paso de los años: Cristina, Nerea, Clara; han sido y serán siempre un pilar muy importante en mi vida.

Mari Carmen, mi bailarina murcianica. A ti te conocí fuera del ámbito científico, pero en un entorno esencial para mí: la danza. Gracias por ser un pilar esencial en mi vida fuera de casa.

Probablemente me esté dejando en el tintero a mucha gente que ha pasado por mi vida a lo largo de estos años y de las que he aprendido algo. A todas ellas, también gracias por haberme enseñado algo útil para continuar con mi vida.

En definitiva, puedo decir que el período de vivencias de la tesis ha estado lleno de momentos buenos y no tan buenos, de risas y lágrimas, pero, sobre todo, de gente que me ha aportado algo y que, espero, poder seguir conservando en mi vida.

Finalmente, esta tesis ha sido posible, gracias al financiamiento recibido del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional I+D+I (SAF2017-86266-R); de la Comisión Europea (MYOCURE, PHC-14-2015, Project nº667751); de l'Agència de Gestió d'ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1669); de la Asociación de las Mucopolisacaridosis y Síndromes Relacionados (MPS ESPAÑA); y de los Laboratorios del Dr. Esteve S.A.



---

°C	Grado Centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
4-MU	4-Metilumbeliferona
AAP	Proteína activadora de ensamblaje
AAV	<i>Adeno-associated virus</i> ; Virus adenoasociado
ATP	Adenosín trifosfato
BM	<i>Basilar Membrane</i> ; Membrana basilar
BHR	Barrera Hematorretiniana
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAG	<i>Chicken β-actin</i>
cm	Centímetro
CMV	Citomegalovirus
CsCl	Cloruro de Cesio
D-GlcA	ácido glucurónico
D-GlcN	N-acetil-D-glucosamina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ; Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ERT	<i>Enzyme Replacement Therapy</i> ; Terapia de Reemplazo Enzimático
EURORDIS	<i>European Rare Diseases Organization</i>
FR	Fotorreceptores
g	gramos
GAG	Glicosaminoglicano

## Abreviaciones

---

<b>GCL</b>	<i>Ganglion Cell Layer</i> ; Capa de células ganglionares
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; Proteína Verde Fluorescente
<b>h</b>	Hora
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HC</b>	<i>Hair Cell</i> ; Célula ciliada
<b>HS</b>	Heparán Sulfato
<b>IC</b>	Intracisterna
<b>IHC</b>	<i>Inner Hair Cells</i> ; Células ciliadas internas
<b>IPL</b>	<i>Inner Plexiform Layer</i> ; Capa plexiforme interna
<b>INL</b>	<i>Inner Nuclear Layer</i> ; Capa nuclear interna
<b>ITR</b>	<i>Inverted Terminal Repeat</i> ; Repetición Terminal Invertida
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LIMP2</b>	<i>Lysosomal Integrated Membrane Protein 2</i>
<b>LSD</b>	<i>Lysosomal Storage Diseases; Enfermedad de acúmulo lisosomal</i>
<b>m</b>	metro
<b>M6P</b>	Mannosa-6-fosfat
<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> ; Espectrometría de masas en cromatografía líquida
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquídeo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

---

<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPR</b>	Receptor de Mannosa-6-fosfat
<b>MPS</b>	Mucopolisacaridosis
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b><i>Naglu</i></b>	Gen $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa
<b>NAGLU</b>	Proteína $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa
<b>ND</b>	No detectable
<b>nm</b>	nanometro
<b>NO</b>	Nervio óptico
<b>NPC1</b>	Enfermedad de Niemann-Pick tipus C1
<b>NPC2</b>	Enfermedad de Niemann-Pick tipus C2
<b>O/N</b>	<i>Overnight</i>
<b>OHC</b>	<i>Outer Hair Cells</i> , Células ciliadas externas
<b>ONL</b>	<i>Outer Nuclear Layer</i> ; Capa nuclear externa
<b>OPL</b>	<i>Outer Plexiform Layer</i> ; Capa plexiforme externa
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> ; Marco Abierto de Lectura
<b>pb</b>	<i>Base pair</i> , Par de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>pH</b>	Potencial d'hidrogen
<b>PolyA</b>	Poliadenilación
<b>qPCR</b>	<i>quantitative Real-Time PCR</i> ; PCR cuantitativa en tiempo real
<b>rAAV</b>	Vector adenoasociado recombinante
<b>RB</b>	<i>Roller Bottle</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RPE</b>	<i>Retinal Pigmented Epithelium</i> ; Epitenilo pigmentado retiniano

## Abreviaciones

---

<b>rpm</b>	Revolución por minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Error estándar de la media
<b>Ser</b>	Serina
<b>SER-CBATEG</b>	Servicio Estabulación Ratones- CBATEG
<b>SL</b>	<i>Spiral Limbus</i> ; Limbo espiral
<b>SLg</b>	Spiral Ligament; <i>Ligamento espiral</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>St V</b>	<i>Stria Vascularis</i>
<b>SUMF1</b>	<i>Sulfatase Modifying Factor 1</i>
<b>TAE</b>	Tampón Tris-Acetato-EDTA
<b>TM</b>	<i>Tectorial Membrane</i> ; Membrana tectorial
<b>UA</b>	Unidades Arbitrarias
<b>UAB</b>	Universidad Autónoma de Barcelona
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>V</b>	Voltio
<b>vg</b>	<i>Viral Genome</i> ; Genoma Viral
<b>w/v</b>	<i>Weight/Volume</i> ; Peso/Volumen
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i> ; Tipo salvaje





I.	PRESENTACIÓN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	5
1.	ENFERMEDADES MINORITARIAS .....	5
2.	LISOSOMAS Y ENFERMEDADES POR ACÚMULO LISOSOMAL .....	7
2.1.	Lisosomas y enzimas lisosomales .....	8
2.2.	Enfermedades por acúmulo lisosomal .....	10
2.3.	Glucosaminoglicanos .....	13
3.	MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IIIB .....	17
3.1.	Alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU).....	19
3.2.	Sintomatología de la MPSIIIB .....	20
3.3.	Diagnóstico de la MPSIIIB .....	22
3.4.	Modelo murino de la MPSIIIB .....	23
3.5.	Tratamiento para la MPSIIIB .....	24
4.	TERAPIA GÉNICA <i>IN VIVO</i> MEDIADA POR VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS .....	26
4.1.	Producción de los vectores AAV recombinantes .....	28
4.2.	Terapia génica <i>in vivo</i> con vectores AAV para la MPSIIIB .....	31
4.2.1.	<i>Administración de vectores AAV al parénquima cerebral .....</i>	<i>31</i>
4.2.2.	<i>Administración intravascular de vectores AAV.....</i>	<i>32</i>
4.2.3.	<i>Administración de vectores AAV al LCR.....</i>	<i>34</i>

4.2.4. <i>Terapia génica in vivo para la MPSIIIB mediante la administración de vectores AAV9 al LCR</i> .....	36
5. ESTRUCTURAS SENSORIALES.....	38
5.1. Anatomía y fisiología del oído.....	38
5.2. Anatomía y fisiología del ojo.....	42
6. AFECTACIONES NEUROSENSORIALES EN LAS MPSs .....	47
6.1. Afectaciones otológicas .....	47
6.2. Afectaciones visuales.....	48
III. OBJETIVOS.....	51
IV. RESULTADOS.....	55

**Parte 1. Determinación de la dosis mínima terapéutica del vector AAV9-Naglu para el tratamiento de la MPSIIIB**

1. ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DISTINTAS DOSIS DEL VECTOR VIRAL AAV9-Naglu SOBRE LA PATOLOGÍA NEUROLÓGICA DE LA MPSIIIB .....	60
1.1. Recuperación de la actividad NAGLU y del contenido de GAGs en el encéfalo .....	60
1.2. Reversión de la neuroinflamación .....	62

<b>2. ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-<i>Naglu</i> SOBRE LA PATOLOGÍA PERIFÉRICA .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Recuperación de la actividad NAGLU y corrección del acúmulo de GAGs en tejidos periféricos .....</b>	<b>67</b>
<b>2.2. Efecto del tratamiento con el vector AAV9-<i>Naglu</i> sobre las organomegalias.....</b>	<b>69</b>
<b>2.3. Efecto del tratamiento con el vector AAV9-<i>Naglu</i> sobre las alteraciones del comportamiento.....</b>	<b>70</b>
<b>2.4. Efecto del tratamiento con el vector AAV9-<i>Naglu</i> sobre la supervivencia .....</b>	<b>73</b>

**Parte 2. Evaluación de la función auditiva tras el tratamiento de ratones MPSIIIB con el vector AAV9-*Naglu***

<b>1. BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR VIRAL AAV9 EN LA CÓCLEA TRAS LA ADMINISTRACIÓN AL LCR VÍA CISTERNA MAGNA .....</b>	<b>79</b>
<b>2. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR AAV9-<i>Naglu</i> SOBRE LA FUNCIÓN AUDITIVA.....</b>	<b>83</b>
<b>2.1. Corrección de la actividad NAGLU y normalización del contenido de GAGs en la cóclea.....</b>	<b>84</b>
<b>2.2. Conservación de la citoarquitectura de la cóclea.....</b>	<b>85</b>
<b>2.3. Evaluación del tratamiento en la función auditiva.....</b>	<b>87</b>

---

**Parte 3. Evaluación de la función visual tras el tratamiento de ratones MPSIIIB con el vector AAV9-Naglu**

1. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO A LARGO PLAZO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR AAV9-Naglu SOBRE LA FUNCIÓN VISUAL .....	91
1.1. Aumento de la actividad NAGLU en el ojo y corrección a largo plazo del contenido de GAGs en la retina .....	92
1.2. Efecto del tratamiento IC con el vector AAV9-Naglu sobre la gliosis en la retina .....	94
1.3. Prevención de la pérdida neuronal en la retina .....	96
1.4. Prevención de la pérdida de fotorreceptores en la retina .....	98
1.5. Efecto del tratamiento IC con el vector AAV9-Naglu sobre la función visual.....	100
V.    DISCUSIÓN .....	109
VI.   CONCLUSIONES .....	121
VII.  MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
1.  MATERIALES.....	127
1.1. Animales .....	127
1.2. Anticuerpos .....	127
1.3. Reactivos .....	129
2.  MÉTODOS.....	129

<b>2.1. Técnicas de obtención y manipulación del RNA .....</b>	<b>129</b>
<b>2.1.1. <i>Aislamiento y purificación de RNA total</i> .....</b>	<b>129</b>
<b>2.1.2. <i>Síntesis del cDNA</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>2.1.3. Cuantificación de la expresión del mRNA por Real-Time qPCR...</b>	<b>130</b>
<b>2.2. Transfección de cultivos celulares HEK-293 con DNA plasmídico .....</b>	<b>131</b>
<b>2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados.....</b>	<b>131</b>
<b>2.3.1. Producción y purificación .....</b>	<b>131</b>
<b>2.3.2. Titulación de genomas virales .....</b>	<b>133</b>
<b>2.3.3. Cuantificación de partículas virales .....</b>	<b>134</b>
<b>2.4. Administración in vivo de los vectores AAV.....</b>	<b>135</b>
<b>2.5. Eutanasia y obtención de muestras biológicas post mortem de ratones.....</b>	<b>135</b>
<b>2.6. Protocolo de descalcificación de cócleas de ratón.....</b>	<b>136</b>
<b>2.7. Western blot .....</b>	<b>136</b>
<b>2.7.1. Cuantificación del contenido proteico por el método Bradford ...</b>	<b>136</b>
<b>2.7.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).....</b>	<b>137</b>
<b>2.7.3. Electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF.....</b>	<b>138</b>
<b>2.7.4. Incubación y revelado .....</b>	<b>138</b>
<b>2.8. Determinación de la actividad enzimática.....</b>	<b>138</b>
<b>2.8.1. Determinación de la actividad enzimática NAGLU .....</b>	<b>138</b>
<b>2.9. Inmunohistoquímica de secciones tisulares en bloques de parafina ....</b>	<b>139</b>
<b>2.10. Determinación del área positiva de las inmunohistoquímicas de campo claro y fluorescencia .....</b>	<b>140</b>

---

2.11. Cuantificación de células positivas de las inmunohistoquímicas de fluorescencia.....	140
2.12. Determinación del contenido de GAGs en órganos y tejidos.....	140
2.13. Actímetro.....	141
2.14. Pruebas funcionales.....	141
2.14.1. Auditory Brainstem Response (ABR).....	141
2.14.2. Electrorretinograma (ERG).....	141
2.14.3. Optomotor Response (OR).....	143
2.14.4. <i>Vsual Water Task (VWT)</i> .....	144
2.15. Análisis estadístico .....	145
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	147



## ***I. Presentación***





La MPSIIIB es una enfermedad rara de acúmulo lisosomal causada por la deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU). Esta enfermedad presenta una herencia autosómica recesiva con una baja prevalencia en la población mundial. La enzima NAGLU está implicada en la degradación secuencial del glucosaminoglicano (GAG) heparán sulfato (HS). La deficiencia de esta enzima es la responsable de la acumulación patológica de formas parcialmente degradadas de HS en el interior de los lisosomas celulares. Este depósito anómalo provoca la disfunción celular y, finalmente, la muerte de las células. La principal afectación de la MPSIIIB es a nivel del sistema nervioso central (SNC) y está caracterizada por una severa y progresiva neurodegeneración y neuroinflamación. Éstas vienen acompañadas por afectaciones moderadas a nivel de tejidos periféricos. Con la edad, los pacientes de la MPSIIIB también desarrollan afectaciones otológicas y oculares que provocan la pérdida de audición y de la función visual.

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo aprobado para la cura de las alteraciones relacionadas con la MPSIIIB. Los tratamientos existentes son paliativos sintomáticos que pretenden mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias. Por tanto, la búsqueda de una terapia que permita revertir de forma eficaz estas alteraciones supondría una nueva esperanza para los afectados de dicha enfermedad.

Con anterioridad, nuestro laboratorio demostró la eficacia terapéutica de una aproximación de terapia génica sobre la corrección de las afectaciones del SNC y periféricas en el modelo murino de la MPSIIIB (*Ribera, 2015*). Este estudio puso de manifiesto la capacidad de corregir la patología neurológica y somática en ratones MPSIIIB tras una única administración intracisterna (IC) al líquido cefalorraquídeo (LCR) de vectores AAV9 codificantes para la proteína NAGLU murina (*Ribera, 2015*). Dado que la dosis administrada en este estudio era de  $3.0 \times 10^{10}$  genomas virales (vg)/ratón, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue la búsqueda de una dosis menor que alcanzara los mismos efectos terapéuticos. Además, tras la designación de la dosis mínima terapéutica, también se estudió el efecto de la misma sobre las alteraciones neurosensoriales que afectan a las funciones auditiva y visual de dicho modelo animal.

En la búsqueda de la mínima dosis terapéutica se evaluó el efecto de 4 dosis equidistantes entre sí tanto a nivel del SNC como periférico. Las dosis estudiadas fueron de  $2.0 \times 10^9$ ,  $4.3 \times 10^9$ ,  $9.3 \times 10^9$  y  $2.0 \times 10^{10}$  vg/ratón y se observó que, en la mayoría de los parámetros analizados, se daba una respuesta dosis-dependiente. A pesar de que todas las dosis del estudio mostraban una mejoría en la mayoría de los parámetros analizados, eran las 2 dosis más altas las que presentaban una mayor corrección de las

afectaciones neurológicas y periféricas tras 4 meses de tratamiento. Además, para comprobar completamente su efecto terapéutico, también se evaluó el efecto de las distintas dosis sobre el comportamiento y la esperanza de vida del modelo animal. Al igual que en los otros parámetros analizados, en éstos también se apreció una respuesta dosis-dependiente, siendo las dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg las que presentaron una mayor corrección de los parámetros conductuales y un claro aumento de la esperanza de vida de este modelo murino. Por ello, se consideró la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg como la dosis mínima terapéutica, ya que no sólo daba lugar a la corrección de la neuroinflamación y de la acumulación patológica lisosomal, sino que, además, era la dosis mínima con la que se observó una corrección de las alteraciones conductuales.

El siguiente objetivo de esta tesis se fundamentó en la evaluación de la eficacia terapéutica de la administración IC del vector AAV9-*Naglu* a la dosis mínima terapéutica ( $9.3 \times 10^9$  vg) sobre las afectaciones neurosensoriales que alteraban las funciones auditiva y visual. Este estudio puso de manifiesto que, tras 4 meses de tratamiento con el vector terapéutico, los ratones MPSIIIB preservaban la función auditiva. Asimismo, se observó que los ratones MPSIIIB tratados con dicho vector también conservaban parcialmente la función visual a largo plazo, es decir, tras 10 meses de tratamiento.

El conjunto de estos resultados demostró la eficacia terapéutica de una única administración IC al LCR en ratones MPSIIIB jóvenes sobre la conservación de las afectaciones neurosensoriales que alteran las capacidades auditiva y visual. Frente a la carencia de un tratamiento efectivo aprobado capaz de revertir las afectaciones de la MPSIIIB, esta aproximación de terapia génica se presenta como una atractiva alternativa en el tratamiento de las alteraciones periféricas y neurosensoriales que derivan de la profunda afectación del SNC en esta enfermedad.

## ***II. Introducción***



## 1. ENFERMEDADES MINORITARIAS

Las enfermedades minoritarias o enfermedades raras se caracterizan por ser enfermedades crónicas, progresivas, degenerativas y, habitualmente, fatales, según la última actualización de EURORDIS (*European Rare Diseases Organization*) en mayo de 2020 (<https://www.eurordis.org/content/what-rare-disease>). La mayoría de estas enfermedades son discapacitantes, afectando a la autonomía del individuo y a su correspondiente calidad de vida. Existen entre 6.000 y 8.000 enfermedades raras, de las cuales un 75% afectan a niños y, de éstos, el 30% suelen morir antes de los 5 años. El 80% de estas enfermedades presentan un origen genético, mientras que el resto son resultado de infecciones bacterianas o víricas, alergias o causas ambientales. Dichas enfermedades también se caracterizan por la amplia variedad de desórdenes y síntomas que presentan. Además, éstos difieren, no sólo entre enfermedades, sino entre individuos que presentan una misma enfermedad.

Según una estimación aproximada, las enfermedades minoritarias afectan a 400 millones de personas en todo el mundo, siendo alrededor de 30 millones de personas en Europa y 25 millones en Estados Unidos.

Cada país tiene diferentes parámetros para clasificar una enfermedad como rara, razón por la que no existe un consenso único, claro y aceptado para identificar una enfermedad de baja prevalencia como enfermedad minoritaria. De esta manera, en EE.UU. se considera que una enfermedad es minoritaria cuando afecta a menos de 200.000 personas, mientras que en Europa el criterio es de 1 entre 2.000.

A nivel mundial, entre el 6 y el 8% de la población estaría afectada por alguna de estas enfermedades. En España, se calcula que cerca de unos 3 millones de personas padecerían una de dichas enfermedades minoritarias.

## 2. LISOSOMAS Y ENFERMEDADES POR ACÚMULO LISOSOMAL

Las enfermedades por acúmulo lisosomal o LSDs (*Lysosomal Storage Diseases*) son un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias caracterizadas por un depósito o acúmulo anómalo de sustratos parcialmente degradados en los lisosomas celulares. Este acúmulo es debido a deficiencias en las enzimas lisosomales que participan en el procesamiento y la degradación de dichos sustratos (Sun, 2018). Esta acumulación deriva en una disfuncionalidad y posterior muerte celular.

Las LSDs son un grupo genético y clínicamente heterogéneo comprendido por unas 70 enfermedades monogénicas hereditarias. Frecuentemente, presentan neurodegeneración pediátrica y visceromegalias, aunque pueden verse afectadas otras partes del organismo, como el esqueleto, el corazón o la piel (*Platt, 2018*).

### 2.1. Lisosomas y enzimas lisosomales

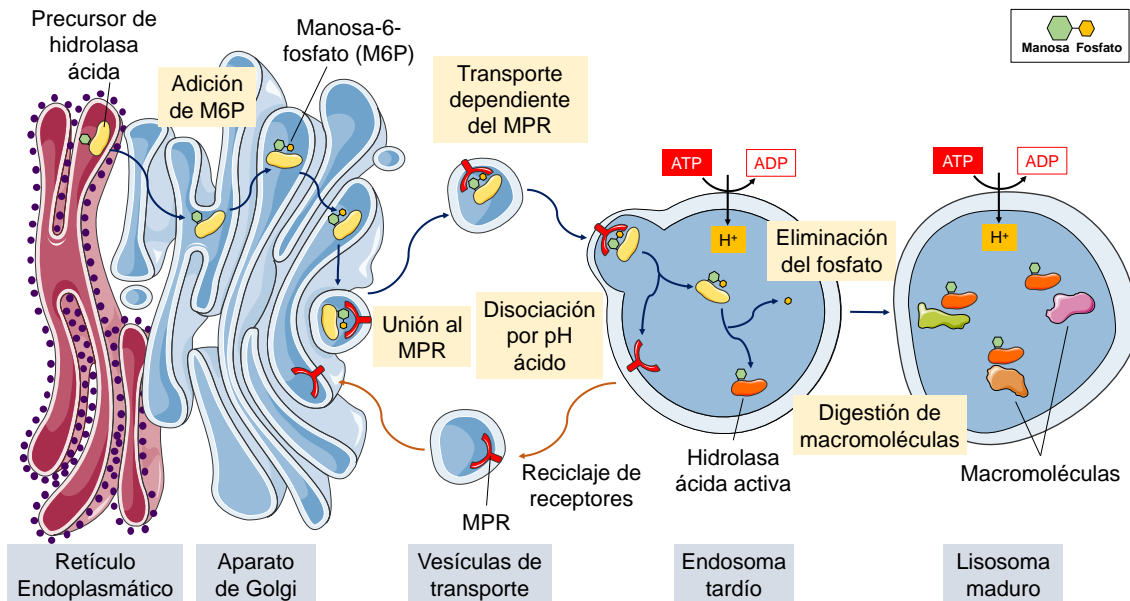
Los lisosomas fueron descritos por primera vez por deDuve en los años 50 del siglo pasado (*de Duve, 2005*). Se trata de orgánulos catabólicos encargados, principalmente, de la función digestiva y del reciclaje de diversos sustratos que incluyen a los glucosaminoglicanos, esfingolípidos, glucógeno y proteínas (*Parenti, 2015*). Además, los lisosomas también están implicados en otras funciones fundamentales como la secreción, señalización, metabolismo energético, inmunidad y reparación de la membrana celular (*Settembre, 2013*).

La función catabólica de estos orgánulos está realizada por, aproximadamente, 60 hidrolasas pertenecientes a diferentes familias proteicas que incluyen a las glucosilasas, sulfatasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas (*Parenti 2015*). Estas enzimas se encuentran en el interior de los lisosomas y son activas a un pH de 5,5, por lo que también se les conoce como hidrolasas ácidas. Estas hidrolasas son inactivas fuera de un estrecho rango de pH, lo cual previene de una posible autodigestión celular incontrolada en caso de que la membrana lisosomal se rompiera y hubiera un abocamiento del contenido lisosomal al citosol, cuyo pH es de 7,2 (*Cooper, 2000; Mindell, 2012*).

Las hidrolasas ácidas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso. De éste se desprenden vesículas que las contienen y se fusionarán con el aparato de Golgi. Allí, tendrán lugar una serie de modificaciones post-traduccionales (glucosilaciones en su mayoría), de entre las que se destaca la adición del residuo manosa-6-fosfato (M6P) a los extremos terminales de las cadenas de oligosacáridos. La M6P es la marca distintiva de estas enzimas, pues en el *trans*-Golgi son reconocidas por los receptores de M6P (MPR) (*Ghosh, 2003; Braulke, 2009*).

Los lisosomas primarios, vesículas de nueva formación y pH ligeramente ácido, se desprenden del aparato de Golgi y contienen dichas hidrolasas ácidas. Éstas están unidas a los MPR mediante el residuo M6P. Estos lisosomas primarios se fusionan con otras vesículas denominadas endosomas tardíos. Una vez fusionados, y gracias a la presencia de bombas de protones en la membrana de los lisosomas primarios, el lumen

se acidifica y las enzimas se disocian de los MPR (*Ohkuma, 1982*). A continuación, estos receptores pueden ser reciclados mediante el retorno al aparato de Golgi o viajando a la membrana plasmática, en donde serán responsables de la captación de hidrolasas ácidas secretadas por otras células. Los endosomas tardíos, que contienen macromoléculas y otros productos que deben digerirse, se van acidificando hasta convertirse en los lisosomas secundarios. Este pH más ácido permite la activación de las hidrolasas de su interior y la degradación de su contenido (**Figura 1**).

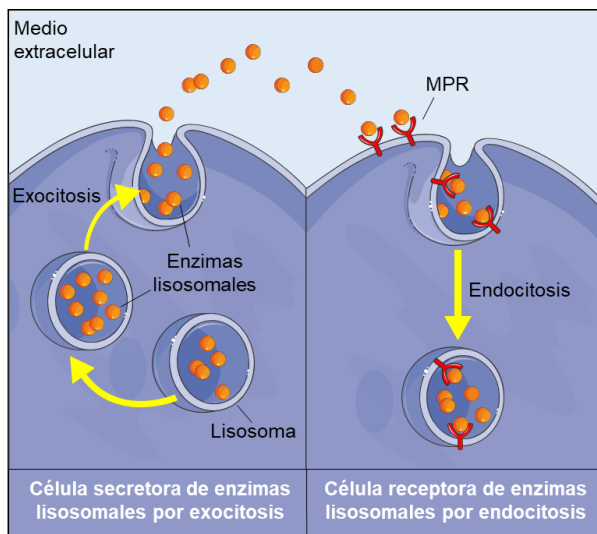


**Figura 1. Lisosomas e hidrolasas ácidas.** Las hidrolasas ácidas son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso. De ahí, viajan hasta el aparato de Golgi, donde se les añadirá una molécula de M6P. Ésta permitirá que dichas hidrolasas puedan ser reconocidas por el MPR y transportadas en vesículas hasta fusionarse con los endosomas tardíos. El pH ácido de estos endosomas permite la disociación entre las enzimas y los receptores, facilitando así la activación de las hidrolasas. Mientras los endosomas tardíos maduran a lisosomas, los MPR pueden ser transportados y expuestos en la membrana celular para la captación de hidrolasas secretadas por células vecinas o reciclados hacia el aparato de Golgi de la propia célula.

Una característica particular de las hidrolasas ácidas es que no sólo son capaces de realizar su función en la célula donde son sintetizadas, sino que también pueden ejercerla en otra célula vecina o distante que sea capaz de captarlas mediante la expresión del MPR en su membrana plasmática. Es decir, las vesículas que se dependen del aparato de Golgi que contienen las hidrolasas ácidas pueden fusionarse con la membrana plasmática celular, liberando al medio extracelular o al torrente sanguíneo dichas enzimas. Las hidrolasas ácidas serían reconocidas por los MPR de otra célula, internalizadas y pasarían a ser funcionales en nuevas vesículas de las células que las han captado. Este mecanismo se denominaría “mecanismo de



corrección cruzada” cuando la célula que capta las hidrolasas ácidas es incapaz de sintetizarlas por sí misma (**Figura 2**).



**Figura 2. Mecanismo de corrección cruzada.** Las hidrolasas ácidas pueden realizar su función en la célula donde han sido sintetizadas o pueden ser secretadas al medio extracelular o al torrente sanguíneo por medio de exocitosis. La expresión del MPR en la membrana plasmática celular permite que otras células puedan reconocer e internalizar dichas hidrolasas. Así, las enzimas pueden realizar su función en una célula distinta a donde han sido sintetizadas. Se denomina proceso de “corrección cruzada” cuando las células que captan las hidrolasas ácidas secretadas por otras células son incapaces de sintetizarlas por sí mismas.

## 2.2. Enfermedades por acúmulo lisosomal

En las LSDs, la deficiencia de funcionalidad en alguna de las enzimas lisosomales genera una acumulación patológica de sustratos parcialmente degradados en los lisosomas, ocasionando una distensión anómala de los mismos. La acumulación de un sustrato en particular es lo que se emplea para la clasificación de las distintas LSDs (**Tabla 1**).

A excepción de algunas enfermedades clasificadas dentro de las LSDs que presentan herencia ligada al cromosoma X, como la enfermedad de Hunter (Mucopolisacaridosis tipo II), la enfermedad de Fabry o la de Danon, el resto de LSDs presentan una herencia autosómica recesiva. Aun así, todas ellas son enfermedades monogénicas que afectan, en su gran mayoría, a enzimas lisosomales, ya sean solubles o de membrana. Sólo una minoría de estas enfermedades presentan mutaciones en genes que codifican para enzimas no lisosomales pero que están implicadas en la biogénesis lisosomal o en la maduración de enzimas lisosomales (*Neufeld, 1991; Dierks, 2009*). Algunos ejemplos podrían ser enfermedades como la de Niemann-Pick C1, las Mucopolisacaridosis tipo II y III o la enfermedad de Austin (Deficiencia múltiple de sulfatasas) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades por acúmulo lisosomal (Parte I)

Enfermedad	Otros nombres	Proteína deficitaria	Productos acumulados
<b>Defectos en la degradación de Glicoproteínas</b>			
Mucopolipidosis I (tipo I y II)	Sialidosis	$\alpha$ -N-acetilneuraminidasa	Sialil-oligosacáridos
Galactosialidosis		Catepsina A	Sialil-oligosacáridos
$\alpha$ -Manosidosis		$\alpha$ -manosidasa	Oligosacáridos con manosa
$\beta$ -Manosidosis		$\beta$ -manosidasa	Oligosacáridos con manosa
Aspartilglucosaminuria		Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
$\alpha$ -Fucosidosis		$\alpha$ -L-fucosidasa	Oligosacáridos con fucosa
Enfermedad de Schindler		$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	Oligosacáridos con N-acetilgalactosamina
<b>Defectos en la degradación de Glicolípidos</b>			
GM1 Gangliosidosis (tipo I, II y III) <sup>a</sup>		$\beta$ -galactosidasa	Gangliósidos GM1
GM2 Gangliosidosis	Enfermedad de Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa (subunidad $\alpha$ )	Gangliósidos GM2
GM2 Gangliosidosis	Enfermedad de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa (subunidad $\beta$ )	Gangliósidos GM2
GM2 Gangliosidosis (variante AB)	Tay-Sachs (variante AB)	Proteína activadora de GM2	Gangliósidos GM2
Enfermedad de Gaucher (tipo I, II y III) <sup>b</sup>		Glucocerebrosidasa	Glucosilceramidas
Enfermedad de Gaucher (variante)		Saponsin C	Glucosilceramidas
Leucodistrofia Metacromática		Ariilsulfatasa A	Glicolípidos sulfatados
Leucodistrofia Metacromática (variante)		Saponsin B	GM1 y Glicolípidos sulfatados
Deficiencia múltiple de Sulfatasas	Enfermedad de Austin / Mucosulfatidosis	c- $\alpha$ -formylglycine-generating enzyme	Galactocerebrósidos sulfatados
Leucodistrofia de células globoides	Enfermedad de Krabbe	$\beta$ -galactosilceramidasa	Galactosilceramidas
Enfermedad de Fabry		$\alpha$ -galactosidasa A	Globotriaosilceramidas
Enfermedad de Fabry (variante) <sup>c</sup>		$\alpha$ -galactosidasa A	Globotriaosilceramidas
<b>Defectos en la degradación de Mucopolisacáridos - Mucopolisacaridosis</b>			
MPS I	Síndrome de Hurler, Scheie y Hurler/Scheie <sup>d</sup>	$\alpha$ -iduronidasa	Dermatán y Heparán sulfato
MPS II	Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa	Dermatán y Heparán sulfato
MPS III	Síndrome de Sanfilippo		
MPS IIIA	Síndrome de Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
MPS IIIB	Síndrome de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
MPS IIIC	Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosaminidasa N-acetiltransferasa	Heparán sulfato
MPS IIID	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
MPS IV	Síndrome de Morquio		
MPS IVA	Síndrome de Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa	Queratán y Condroitín sulfato
MPS IVB	Síndrome de Morquio B	$\beta$ -galactosidasa	Queratán sulfato
MPS VI	Síndrome de Morateaux-Lamy	Ariilsulfatasa B	Dermatán sulfato
MPS VII	Síndrome de Sly	$\beta$ -glucuronidasa	Heparán, Dermatán y Condroitín sulfato
MPS IX	Síndrome de Natowicz	Hialuronidasa	Ácido hialurónico

**Tabla 1. Clasificación de las enfermedades por acúmulo lisosomal (Parte II)**

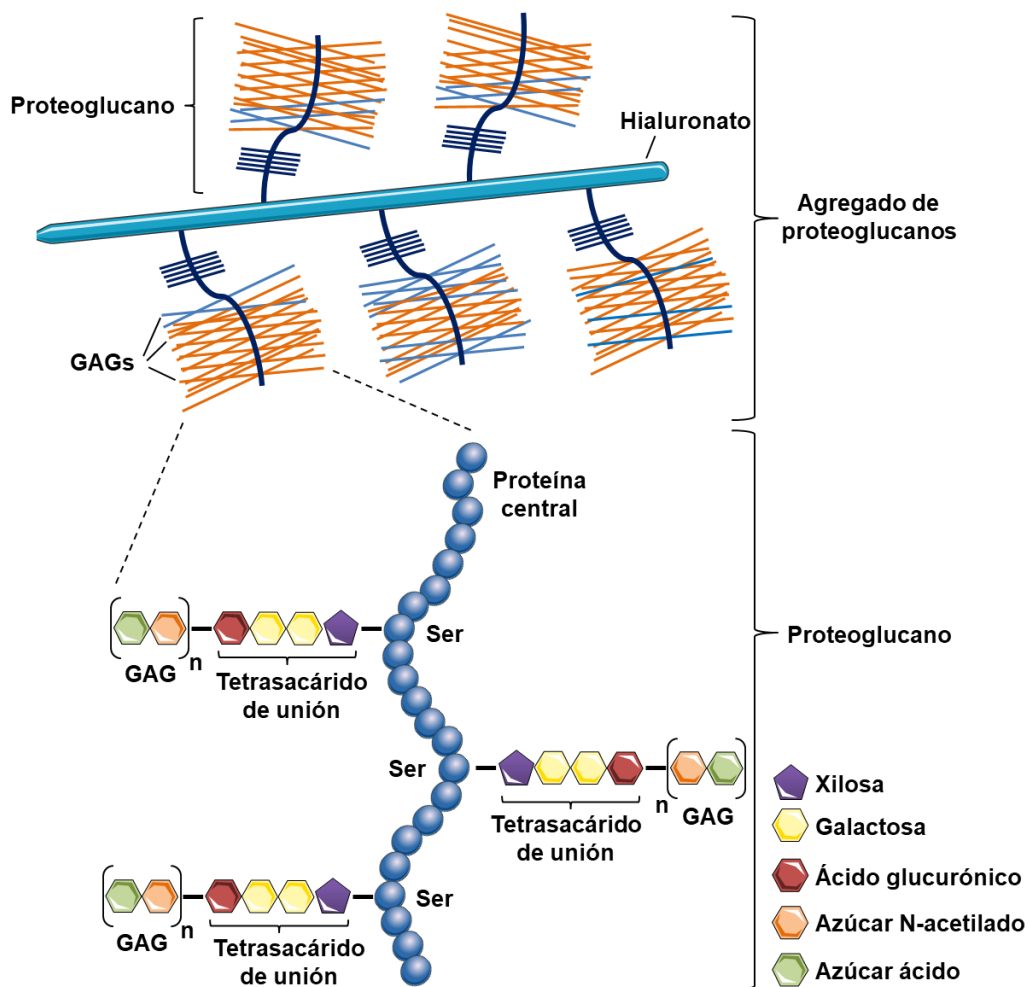
Enfermedad	Otros nombres	Proteína deficitaria	Productos acumulados
<b>Defectos en la degradación del Glucógeno</b>			
Glucogenosis tipo II	Enfermedad de Pompe	α-glucosidasa	Glucógeno
<b>Defectos en la degradación o transporte de Lípidos</b>			
Enfermedad de Niemann-Pick tipo A y B <sup>e</sup>		Esfingomielinasa	Esfingomielina
Enfermedad de Niemann-Pick C1		NPC1	Colesterol y Esfingolípidos
Enfermedad de Niemann-Pick C2		NPC2	Colesterol y Esfingolípidos
Lipogranulomatosis de Farber	Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman		Lipasa ácida lisosomal	Triglicéridos y ésteres de colesterol
<b>Lipofuscinosis neuronal cerioidea (NCL)</b>			
NCL1		Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscina
NCL2	Enfermedad de Jansky-Bielschowsky	Tripeptidil peptidasa 1	Lipofuscina
NCL3	Enfermedad de Batten	Batenina	Lipofuscina
NCL4		DNAJC5	Lipofuscina
NCL5		NCL5	Lipofuscina
NCL6		NCL6	Lipofuscina
NCL7		MFSD8	Lipofuscina
NCL8		NCL8	Lipofuscina
<b>Defectos en la degradación de Polipéptidos</b>			
Picnodisostosis	Síndrome de Toulouse-Lautrec	Catepsina K	Proteínas óseas
<b>Defectos en Transportadores Lisosomales</b>			
Cistinosis		Cistinosisina (Transportador lisosomal de cistina)	Cistina
Enfermedad de Salla	Sialuria	Sialina	Sialil-oligosacáridos
<b>Defectos en proteínas implicadas en el tráfico lisosomal</b>			
AMRS (Arthrogryposis, mental retardation, seizures)		Transportador UDP-N-acetilglucosamina	N-Glicanos ramificados
Mucopolipidosis II - III			
Mucopolipidosis II - III α/β	Polidistrofia pseudo-Hurler	N-Acetilglucosamina-1-Fosfato Transferasa	Oligosacáridos, Mucopolisacáridos y Lípidos
Mucopolipidosis II - III γ		N-Acetilglucosamina-1-Fosfato Transferasa	Oligosacáridos, Mucopolisacáridos y Lípidos
Mucopolipidosis IV	Sialolipidosis	Mucolipidina-1	Mucopolisacáridos y Lípidos
Enfermedad de Danon	Pseudoglucogenosis tipo II	LAMP-2	Glucógeno y debrís citoplasmático
Síndrome de Chédiak-Higashi		LYST	Varios productos
Síndrome de Griscelli			
Síndrome de Griscelli tipo 1		MYO5A	Varios productos
Síndrome de Griscelli tipo 2	Síndrome de Paid	RAB27A	Varios productos
Síndrome de Griscelli tipo 3		Melanofilina	Varios productos
Síndrome de Hermansky-Pudlak		HPS1	Lipofuscina

<sup>a</sup>Diferentes subtipos según la severidad de la enfermedad y la actividad residual de la enzima, siendo el tipo I la más severa y de inicio más temprano. El tipo III es la más leve y de inicio en la edad adulta.

<sup>b</sup>Diferentes tipos según el grado de afectación neuropática. Tipo I: sin afectación; tipo II: afectación neuropática aguda; tipo III: afectación neuropática subaguda. <sup>c</sup>Variante de la Enfermedad de Fabry de muy baja prevalencia con afección cardíaca. <sup>d</sup>Hurler: variante más severa; <sup>e</sup>Scheie: variante más leve; <sup>f</sup>Hurler/Scheie: variante de severidad moderada. <sup>g</sup>Tipo A: forma severa, de aparición infantil y con severa afectación neurológica. Tipo B: variante de inicio en la edad adulta y sin afectación neurológica. Adaptado de (*Futerman and van Meer, 2004; Tollersrud and Berg, 2005; Wilcox, 2004*).

### 2.3. Glucosaminoglicanos

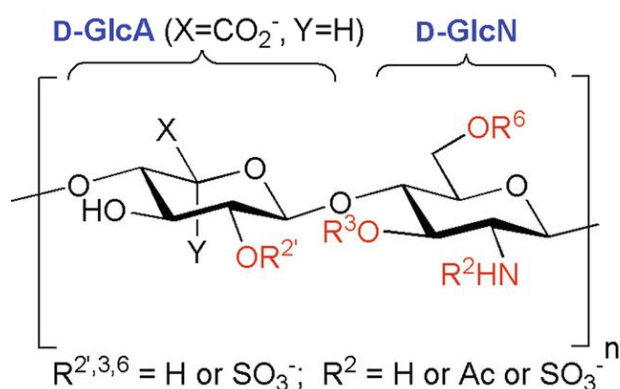
Los glucosaminoglicanos (GAGs), también denominados mucopolisacáridos, forman parte de los proteoglicanos estructurales o de membrana de las células (**Figura 3**). Se dividen en 5 grupos: (1) Heparán sulfato, (2) Condroitín sulfato, (3) Dermatan sulfato, (4) Keratán sulfato y (5) Ácido hialurónico. Estos 5 tipos de GAGs están formados por largas cadenas no ramificadas de polisacáridos cuya unidad básica repetitiva es un disacárido. Dicha unidad básica la conforman una hexosaminidasa (azúcar N-acetilado) unida a un ácido urónico (ácido glucurónico) (**Figura 3**), exceptuando el Keratán sulfato, donde este ácido urónico es sustituido por una galactosa (*Taylor y Gallo, 2006*). Excepto el ácido hialurónico, que no sufre ninguna modificación, la síntesis de los GAGs comporta diferentes acetilaciones, epimerizaciones y sulfataciones esenciales para su función específica.



**Figura 3. Estructura de los proteoglicanos.** La estructura básica de un proteoglicano consta de un núcleo proteico unido por enlaces covalentes a polisacáridos (GAGs). Además, la presencia de grupos sulfatos en su estructura la confiere una carga negativa a estas moléculas.

Los GAGs no solamente presentan una función estructural al estar asociados a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular, sino que también lo están en las formas solubles de éstos e intervienen en procesos inflamatorios (Dreyfuss, 2009; Morla, 2019). Además, estos mucopolisacáridos contribuyen a la correcepción de factores de crecimiento, ayudando así a la diferenciación, división, migración o supervivencia de la célula (Kreuger, 2005; Ashikari-Hada, 2005).

El Heparán Sulfato (HS) es uno de los tipos de GAG que se acumula en algunas mucopolisacaridosis (MPSs). El HS presenta una distribución ubicua, ya que forma parte de los proteoglicanos estructurales de la matriz extracelular y la membrana plasmática de células tanto animales como vegetales. Una unidad de N-acetil-D-glucosamina (D-GlcN) unida a un ácido glucurónico (D-GlcA) es la unidad básica más común que se repite a lo largo de la cadena de HS. La unión de estas unidades se da mediante el enlace O-glucosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 4), mientras que las uniones entre los disacáridos se dan por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). Las modificaciones que sufre el HS durante su síntesis son las responsables de otorgar la función específica que cumplirá este HS en la célula. Estas modificaciones incluyen N-deacetilaciones y N-sulfataciones de la glucosamina, epimerizaciones del ácido glucurónico y sulfataciones de la glucosamina y del ácido urónico en distintas posiciones (Sugahara y Kitawa, 2002; Gallagher, 2006).

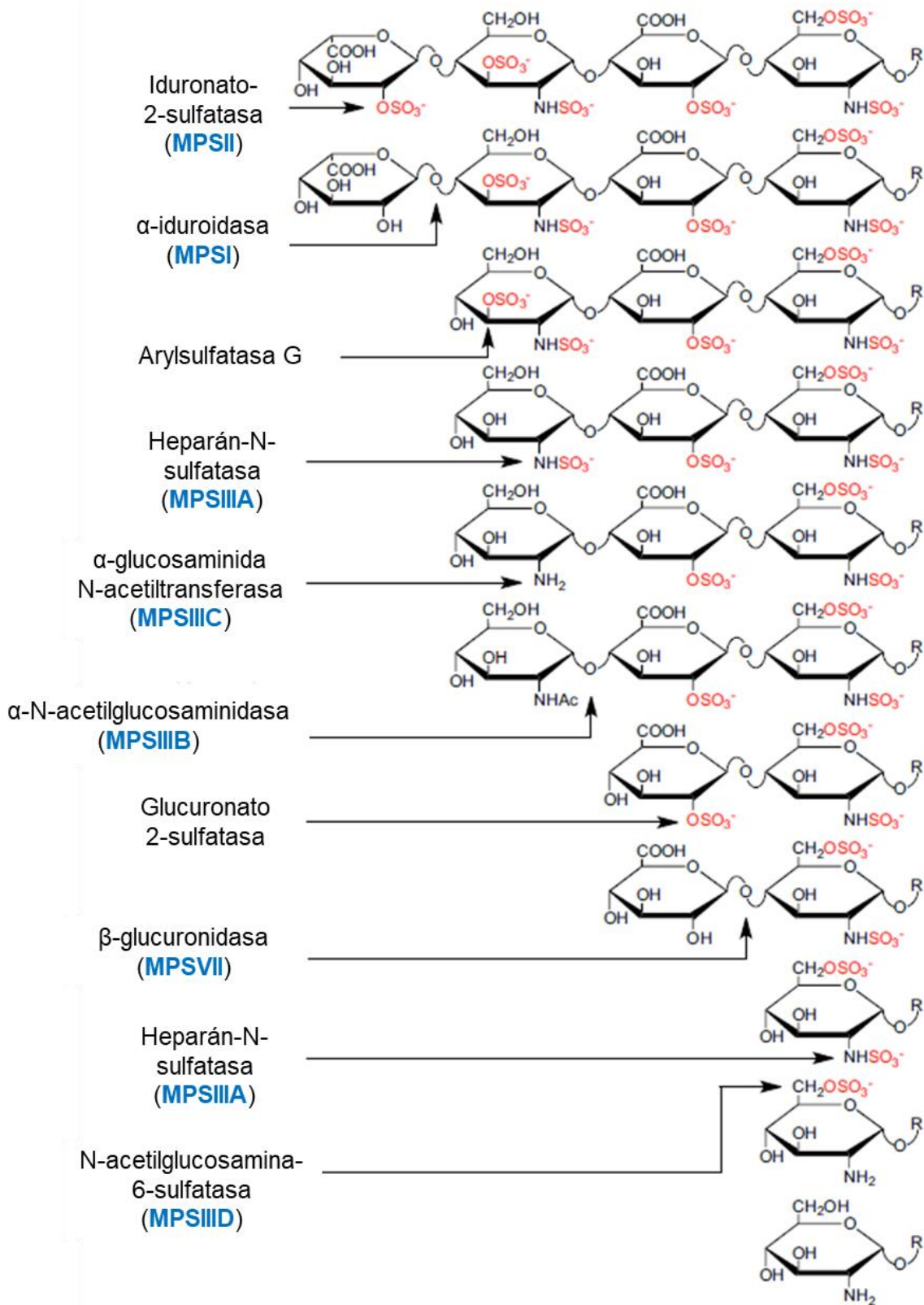


**Figura 4. Estructura del Heparán sulfato.** La unidad básica más comúnmente repetida a lo largo de este GAG es la unión entre una unidad de N-acetil-D-glucosamina (D-GlcN) y un ácido glucurónico (D-GlcA).

El correcto funcionamiento de diversos factores de crecimiento, quimiocinas y proteínas de la matriz extracelular depende de la interacción de estas moléculas con el HS. Por tanto, los proteoglicanos formados por HS (*HSPG: Heparan Sulfate Proteoglycans*) actúan como correceptores de un gran número de moléculas y participan

en un amplio abanico de procesos, como inflamación, angiogénesis, diferenciación celular o señalización nuclear, entre otros (*Dreyfuss, 2009; Stewart y Sanderson, 2013*). La modificación correcta del HS durante su biogénesis es imprescindible para su implicación en la adecuada formación de la retina y el oído interno (*Cai, 2014; Freeman, 2015*).

Las *heparanasas* son las enzimas encargadas de iniciar el proceso de degradación del HS. Actúan directamente sobre los HSPG para liberar las cadenas de GAGs de éste (*Bame, 2001*). Una vez liberadas, dichas cadenas son transportadas a los lisosomas y se produce su degradación propiamente dicha. Esta degradación lisosomal del HS se ha descrito tradicionalmente como un proceso multienzimático donde participan 8 enzimas de manera secuencial. Es la deficiencia de alguna de éstas la causante de los distintos tipos o subtipos de MPS (**Figura 5**). Cuatro de estas 8 enzimas intervienen exclusivamente en la degradación del HS como tal y su deficiencia origina los 4 subtipos del Síndrome de Sanfilippo o MPSIII. Por otro lado, existen otras 3 enzimas implicadas en la degradación del GAG *Dermatán Sulfato*:  $\alpha$ -iduronidasa, iduronato 2-sulfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa, cuya deficiencia provoca la aparición de la MPSI, II y VI, respectivamente (**Tabla 1**). Actualmente, no se conoce ningún defecto de la enzima glucuronato sulfatasa, por lo que no se la asocia con ninguna enfermedad.



**Figura 5. Degradación secuencial del Heparán sulfato.** La degradación del HS es un proceso multienzimático donde intervienen diversas exoglicosidasas, sulfatasas y una transferasa. El déficit de estas enzimas origina diferentes enfermedades (resaltadas en azul). Adaptado de *Kowalewski, 2012*.

### 3. MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IIIB

Las MPSs son un grupo de enfermedades dentro de las LSDs caracterizadas por la ausencia total o parcial de funcionalidad de las enzimas responsables del catabolismo de los mucopolisacáridos o GAGs. Una acumulación patológica sostenida en el tiempo de estos componentes conlleva un daño celular progresivo. Éste afecta a diversos tejidos del sistema y origina, como consecuencia, un fallo orgánico, una reducción significativa en la esperanza de vida y, en algunos casos, una disfunción cognitiva (*Muenzer, 2011; Coutinho, 2012*). En función de la enzima afectada, la acumulación del sustrato parcialmente degradado varía. Esto permite clasificar a las MPSs en 7 tipos diferentes, habiendo subtipos dentro de algunas de ellas (**Tabla 1**). Además, la herencia de todas las MPSs es autosómica recesiva, excepto la MPSII, que presenta una herencia ligada al cromosoma X.

La MPSIII o Síndrome de Sanfilippo se caracteriza por la acumulación del GAG heparán sulfato y se divide en 4 subtipos diferentes: A, B, C y D, dependiendo de la enzima lisosomal deficitaria (**Tabla 1, Figura 5**). El hecho de que haya 4 subtipos hace que exista una gran heterogeneidad en la presentación de la clínica, incluso entre hermanos (*Valstar, 2008*), haciendo que la predicción de la evolución de los pacientes sea difícil. Aunque el subtipo A cursa con un inicio más temprano, una progresión más rápida, una mayor severidad en los síntomas y una menor esperanza de vida (*van de Kamp, 1981; Meyer, 2007; Valstar, 2010a*), se asume que los 4 subtipos son clínicamente muy similares.

En la MPSIIIB, la enzima deficitaria es la  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), una hidrolasa ácida encargada de degradar los extremos no reductores de los residuos de N-acetilglucosamina del HS (actuando como exoglucosidasa) (**Figura 5**). Es una de las cuatro enzimas lisosomales exclusivamente encargadas de la degradación de dicho GAG, por lo que la pérdida de su actividad resulta en una acumulación anómala de HS en los lisosomas.

La característica clínica principal de las formas más severas de la MPSIIIB es una neuropatía progresiva del SNC durante la infancia. La evolución de esta patología se puede dividir en 3 fases: primera, tras un período asintomático durante los primeros meses de vida, comienza una ralentización del desarrollo intelectual; segunda, acompañando al empeoramiento intelectual progresivo, se observa la aparición de alteraciones graves del comportamiento; y tercera, las alteraciones del comportamiento comienzan a desaparecer lentamente, dando paso a una demencia severa combinado con el empeoramiento de la mayoría de funciones motoras. Finalmente, esto da lugar a



la pérdida total de la locomoción, disfagia y lesiones en el sistema piramidal. La muerte de los pacientes suele darse alrededor de la segunda o tercera década de vida (*Neufeld y Muenzer, 2001; Valstar, 2010b*).

En subgrupos de pacientes, se ha descrito otra forma más leve de esta enfermedad, conocida como MPSIIIB de fenotipo atenuado (*Moog, 2007*) (*Valstar, 2010b*) y se caracteriza por un inicio más tardío, una progresión más lenta de la enfermedad y una mayor esperanza de vida de los pacientes.

Debido a la baja prevalencia combinada de los 4 subtipos de la MPSIII, la mayoría de autores están de acuerdo en clasificarla como una enfermedad minoritaria. Estudios epidemiológicos de todo el mundo demuestran la variabilidad existente entre países en cuanto a la incidencia y/o prevalencia de la MPSIIIB. Aun así, a rasgos generales, se puede afirmar que, tanto en el norte de Europa como en Australia, el subtipo A es el más común, mientras que el subtipo B es el que presenta una mayor prevalencia en Brasil y el sur de Europa (excepto en España, donde sigue siendo el subtipo A el más frecuente) (*Coelho, 1997; Emre, 2002; Meikle, 1999; Muenzer, 2011; Delgado, 2013*) (**Tabla 2**).

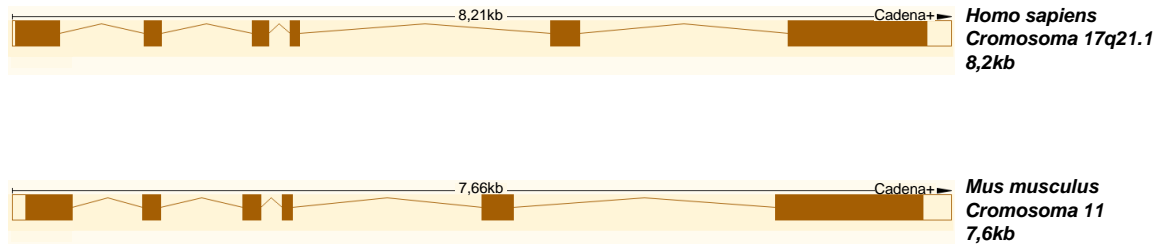
**Tabla 2. Incidencia global de las MPSs.**

<b>Mucopolisacaridosis</b>	<b>Incidencia Global (casos por cada 100.000 nacimientos)</b>
<b>MPSI</b>	0,69 - 1,66
<b>MPSII</b>	0,30 - 0,71
<b>MPSIII</b>	-
<b>MPSIIIA</b>	0,29 - 1,89
<b>MPSIIIB</b>	0,42 - 0,72
<b>MPSIIIC</b>	0,07 - 0,21
<b>MPSIIID</b>	0,1
<b>MPSIV</b>	-
<b>MPSIVA</b>	0,22 - 1,30
<b>MPSIVB</b>	0,02 - 0,14
<b>MPSVI</b>	0,36 - 1,30
<b>MPSVII</b>	0,05 - 0,29
<b>MPSIX</b>	4 casos descritos

Adaptado de (*Muenzer, 2011*)

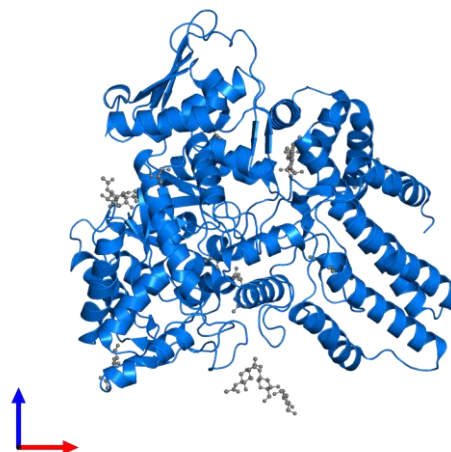
### 3.1. Alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU)

El locus del gen *NAGLU* humano presenta una localización genómica en el cromosoma 17q21.1, se encuentra en la cadena positiva del DNA y comprende unas 8,2 kb. Además, presenta 6 exones de longitud variable entre 86 y 1452 pb (**Figura 6**).



**Figura 6. Representación gráfica esquematizada de los genes codificantes para la proteína NAGLU humana y murina.** Organización, localización cromosómica y tamaño de los genes codificantes para la NAGLU humana y murina. Los rectángulos marrones representan los exones, las líneas que los unen los intrones y los rectángulos sin relleno de color las regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (<http://www.ensembl.org>).

Este gen codifica para la enzima NAGLU, que participa en la degradación del HS catalizando la hidrólisis de las N-acetil-D-glucosaminas de los extremos terminales no reductores transformándolas en N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminidas. Esta enzima de aproximadamente 82 kDa consta de 743 aminoácidos que constituyen la subestructura de monómero y homodímero de su conformación cuaternaria (**Figura 7**) (*GeneCards; Birrane, 2019*).



**Figura 7. Estructura proteica predicha para la enzima NAGLU humana.** Representación gráfica esquematizada del plegamiento tridimensional del modelo de la proteína *NALGU* basado en la homología que presenta con la proteína bacteriana CPGH98 presente en *Clostridium perfringens*.

Hasta la fecha, se han descrito más de 130 mutaciones en el gen *NAGLU* que se puedan asociar con la MPSIIIB. Gran parte de estas mutaciones presentan una baja frecuencia alélica dado que se encuentran sólo en familias concretas. Aun así, se han registrado diversas mutaciones recurrentes en distintas poblaciones. El amplio abanico de mutaciones presentes entre los pacientes de MPSIIIB origina una gran heterogeneidad clínica en los mismos. Además, el hecho de que la principal característica de esta enfermedad sea una degeneración del SNC hace que sea aún más complicada la interpretación del fenotipo clínico.

Se ha postulado que las LSDs presentan un “umbral clínico” de actividad enzimática circulante a partir del cual la enzima deficitaria en cada enfermedad es capaz de degradar su sustrato, disminuyendo su acumulación y evitando, así, que la enfermedad se establezca (*Conzelmann y Sandhoff, 1983; Leinekugel, 1992*). Dicho umbral es particular de cada enfermedad. En el caso de la MPSI, con sólo el 0,1% de actividad enzimática ya se observa una corrección de la acumulación del sustrato en los lisosomas celulares (*Scheuler, 2004*). Sin embargo, gracias a estudios preclínicos basados en aproximaciones de terapia génica o terapias de remplazo enzimático (*ERT: Enzyme Replacement Therapy*) en otras MPSs, se ha observado que se requiere de un mínimo del 5% de actividad enzimática para que dicha corrección de la acumulación de GAGs se produzca en algunos tejidos periféricos (*Donsante, 2007; Garcia, 2007*).

### **3.2. Sintomatología de la MPSIIIB**

Tras un período asintomático, la enfermedad suele presentarse entre el primer y cuarto año de vida, donde el retraso en el desarrollo es el principal síntoma y se ve acompañado por un retraso del habla y problemas en el comportamiento (*Beesley, 1998; Meyer, 2007; Valstar, 2008*).

El SNC se ve claramente afectado (*Whitley, 2018*) y, como extensión de ello, con la edad, aparecen alteraciones en las funciones auditiva y visual, invalidando seriamente dichas capacidades en los pacientes (*Mesolella, 2013; Leung, 1971; Del Monte, 1983*).

En la infancia, la ralentización del desarrollo cognitivo provoca dificultades en el aprendizaje debido a la disminución de las habilidades intelectuales. En las fases iniciales (incluso antes del diagnóstico en muchos de los casos), la pérdida del habla precede al inicio del retraso de las funciones motoras (*Bax y Colville, 1995; Valstar, 2008; Valstar, 2010b*). También, son frecuentes tanto los ataques epilépticos como la falta de coordinación al andar. Las alteraciones en el comportamiento se manifiestan

con inquietud y agitación intensas. Además, el comportamiento hiperactivo, agresivo y destructivo, junto con rabietas (*temper tantrums*) y ataques de llanto son frecuentes en esta etapa (Beesley, 1998; Valstar, 2010b; Delgadillo, 2013). Estos problemas de comportamiento van disminuyendo y terminan por desaparecer a medida que la enfermedad progresa, lo cual da lugar a una completa pérdida de la iniciativa como consecuencia de la demencia severa que presentan (Valstar, 2010b).

El ritmo circadiano normal de estos pacientes está afectado (evidencia demostrada por los alterados niveles de melatonina que presentan) (Mahon, 2014). Estos pacientes suelen tener dificultad para dormirse, un tiempo reducido de sueño nocturno, mala calidad de éste y un aumento de episodios de sueño durante el día (Moog, 2007; Valstar, 2010b).

La mayoría de los pacientes presentan anomalías esqueléticas que incluyen escoliosis, disostosis multiplex, rigidez articular, hiperplasia de los huesos faciales y anomalías que afectan a las extremidades inferiores, entre otros (Moog, 2007). En algunos pacientes, la degeneración articular progresiva que presentan termina degenerando la movilidad normal a la edad aproximada de 10 años (Clearly y Wraith, 1993; Neufeld y Muenzer, 2001). La necesidad de una silla de ruedas depende de la severidad del fenotipo. En el caso de los fenotipos más severos, ésta es precisa desde la adolescencia, mientras que en los casos más leves no se suele necesitar hasta la cuarta década de vida (Meyer, 2007; Valstar, 2010b). En cuanto a los rasgos faciales toscos característicos de las MPSs (cara alargada, frente corta y prominente, labios gruesos y cejas amplias y prominentes), además de estar presente en la mayoría de los pacientes, suelen hacerse más evidentes con la progresión de la enfermedad (Valstar, 2008).

En pacientes jóvenes se suele observar una leve hepatomegalia, siendo la esplenomegalia un rasgo menos frecuente (van de Kamp, 1981; Neufeld y Muenzer, 2001). Sin embargo, las afectaciones cardíacas (arritmias, hipertrofias ventriculares y/o alteraciones valvulares) no suelen darse hasta las fases finales de la enfermedad (Clearly y Wraith, 1993; Valstar, 2010b).

La evolución de la enfermedad viene acompañada por la aparición de dificultades para comer. La progresiva acentuación de este rasgo viene determinada por la imposibilidad de masticar y deglutir (Yogalingam y Hopwood, 2001).

La muerte de estos pacientes se suele dar entre la segunda y la tercera década de vida debido a la neuropatía progresiva del SNC (Bunge, 1999; Meyer, 2007). Aun

así, existe constancia de pacientes mayores de 50 años, por lo que una esperanza de vida más elevada es propia de los fenotipos más atenuados de este síndrome (Moog, 2007; Valstar, 2010b). Las causas de la muerte son principalmente infecciones respiratorias crónicas (habitualmente neumonías), lo que complica la debilidad severa que presentan estos pacientes (Neufeld i Muenzer, 2001; Meyer, 2007; Valstar, 2010b; Delgadillo, 2013).

### **3.3. Diagnóstico de la MPSIIIB**

El diagnóstico de la MPSIIIB es similar al diagnóstico de otras LSD. El análisis más utilizado para confirmar que se trata de una MPS es la determinación de los niveles de GAGs en orina o sangre mediante el siguiente procedimiento:

- Aplicación de azul de dimetilmetileno en fluidos (Whitley 1989). El problema de esta técnica es que no permite identificar el tipo de GAG que se detecta, ya que tiñe todos los GAGs por igual, dando lugar a errores de diagnóstico.
- Cuantificación por ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para cada GAG.
- Cuantificación específica de cada GAG mediante LC-MS/MS, la cual presenta una sensibilidad mucho mayor que los ELISAs (Tomatsu, 2010; Hintze 2011).

Niveles de HS elevados en orina o suero confirman el diagnóstico de la enfermedad MPSIII. Sin embargo, el diagnóstico exacto del síndrome se realiza midiendo la actividad enzimática en los leucocitos de la sangre o bien de los fibroblastos del cultivo de la piel del paciente. Para el análisis de actividad enzimática NAGLU, característica de la MPSIIIB, se pueden realizar los siguientes estudios:

- Mediante el uso de un sustrato sintético conjugado con el fluoróforo 4-Metilumbeliferona (4-MU) (van Diggelen 1990; Karpova, 1996).
- Mediante el uso de sustratos cuantificables por LC-MS/MS (Mashima 2018).

Un análisis genético molecular adicional permite la detección del tipo de mutación que da lugar a la enfermedad. En conjunto, para asegurar un correcto diagnóstico de la MPSIIIB, se debe realizar: (1) una evaluación clínica de los síntomas, (2) el análisis de GAGs en orina y/o suero, (3) la determinación de actividad NAGLU en pacientes con altas concentraciones de HS y (4) la confirmación genética del análisis bioquímico (Shunji Tomatsu 2014; Cozma 2015).

### 3.4. Modelo murino de la MPSIIIB

Los modelos animales murinos son ampliamente empleados por razones obvias de estabulación, manejo y semejanza con el genoma humano. Para el estudio de la MPSIIIB, el modelo animal más extensamente empleado ha sido el modelo de ratón generado por Li y colaboradores en 1999 (Li, 1999). Se trata de un ratón KO (knock-out) para el exón 6 del gen *Naglu*. La disrupción se realiza en este exón debido a que la gran mayoría de mutaciones causantes de la MPSIIIB en pacientes se localizan en esta región (Schmidtchen, 1998). Debido a ello, este modelo presenta una patología muy similar a la descrita en humanos, por lo que se han probado en él distintas aproximaciones terapéuticas (Cressant, 2004; Fu, 2011; Ribera, 2015).

La patología causada por la acumulación aberrante de HS en los lisosomas ya es fácilmente detectable en este modelo animal antes del primer mes de vida (DiRosario, 2009; Villani, 2007) y se puede observar en diversos órganos como el cerebro, hígado, riñones, corazón, bazo y pulmones (Li, 1999; McCarty, 2011; Fu, 2011). Estos animales también acumulan de forma secundaria los gangliósidos GM1, GM2 y GM3 (Li, 1999). Por otra parte, el cerebro presenta una marcada neuroinflamación que se puede detectar en animales jóvenes (Ohmi, 2003; DiRosario, 2009). Dicha neuroinflamación se caracteriza, principalmente, por la presencia de microglía activada y de astrocitos reactivos cuya capacidad de reaccionar frente a posteriores lesiones es reducida (Li, 2002). Se ha observado un aumento progresivo de dichos astrocitos reactivos a medida que el animal envejece, lo cual se relacionaría con la acumulación sostenida en el tiempo de HS. Ésta sería la potencial responsable de los procesos de activación y/o proliferación astrocitaria. Estos astrocitos reactivos también se han observado en autopsias de pacientes MPSIIIB, lo cual indica que el modelo recapitula la patología humana (Tamagawa, 1985).

De manera similar a los pacientes humanos (Del Monte, 1983; Mesolella, 2013), en el modelo murino de la MPSIIIB también se ha observado una clara afectación tanto del oído medio como del interno (Heldermon, 2007), provocando en el animal una hipoacusia progresiva con la edad (Heldermon, 2007). Esta pérdida de la capacidad auditiva se debe a la degeneración de las células ciliadas (HCs: Hair Cells) del oído interno, que son las responsables de la actividad sensorial de este órgano (hipoacusia neurosensorial), y a la malformación ósea presente en el oído medio (hipoacusia conductiva) (Heldermon, 2007).

En cuanto a la capacidad visual, de manera análoga a los pacientes humanos (Ashwoth, 2006; Summers, 2011; Ganesh, 2013), los ratones MPSIIIB de edad

avanzada presentan una marcada neurodegeneración de la retina. Se ha observado que el segmento externo de los fotorreceptores, neuronas responsables de iniciar la transducción del estímulo visual, está disminuido en ratones adultos (Heldermon, 2007), dándose una mayor afectación en un tipo de fotorreceptor (bastones) que en el otro (conos) (Heldermon, 2007; Tse, 2015). Además, hay estudios que demuestran, mediante el análisis de la respuesta eléctrica de la retina, que la funcionalidad de los bastones se ve afectada antes que la de los conos (Tse, 2015). De la misma manera, también se ha observado activación de la microglía y neovascularización en la retina de estos animales (Tse, 2015).

Asimismo, la hiperactividad y alteraciones del ritmo circadiano están presentes en este modelo animal desde muy temprana edad, así como en los humanos (Cressant, 2004; Delgadillo, 2013). A diferencia de la hiperactividad (que se mantiene) (Langford-Smith, 2011), las alteraciones del ritmo circadiano se acentúan con la edad (Heldermon, 2007; Canal, 2010). Esto se debe a una deficiente secreción de melatonina por parte de la glándula pituitaria, la cual no está correctamente estimulada por parte del Núcleo Supraquiasmático, que es el regulador último de los ritmos circadianos (Heldermon, 2007; Canal, 2010).

Así pues, el ratón MPSIIIB presenta alteraciones bioquímicas y características fisiopatológicas semejantes a la patología humana que hacen de éste un buen modelo para estudiar dicha enfermedad y ensayar nuevas terapias.

### **3.5. Tratamiento para la MPSIIIB**

Actualmente, no existe ningún tratamiento específico aprobado que revierta de forma eficaz la enfermedad. Los tratamientos disponibles son únicamente sintomáticos y destinados a disminuir las alteraciones derivadas de la neurodegeneración y de las malformaciones esqueléticas. Estos tratamientos también están enfocados a mejorar la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familias (Rohrbach, 2007; Fedele, 2015; Concolino, 2018).

La Terapia de Reemplazo Enzimático o *Enzyme Replacement Therapy* (ERT) intravenosa (IV) es la terapia que ha demostrado ser más eficiente para el tratamiento de la patología somática periférica de muchas LSDs. Aun así, su principal limitación reside en la capacidad de alcanzar niveles enzimáticos suficientemente elevados en el SNC para lograr un efecto terapéutico. La barrera hematoencefálica (BHE) es el obstáculo crucial que limita dicha terapia, ya que ésta dificulta el paso de moléculas de

gran tamaño desde el torrente circulatorio al SNC. Las estrategias terapéuticas que se centran en superar dicho impedimento se basan en el diseño de la fusión de la enzima deficitaria con otra proteína que pueda ser reconocida por receptores expresados en el endotelio vascular del cerebro. De esta manera, la enzima sería capaz de atravesar la BHE, pasando del torrente sanguíneo al SNC mediante un mecanismo de transporte activo mediado por receptores (Kan, 2014).

Con el objetivo de salvar el obstáculo que supone la BHE, existe la alternativa de administrar las enzimas recombinantes directamente al parénquima cerebral o al LCR mediante la inyección intratecal. Recientemente, estudios sobre la seguridad y tolerabilidad de la administración intratecal del producto AX250 para el tratamiento de la MPSIIIB se encuentran en ensayos clínicos de fase 1/2 (NCT02754076 y NCT03784287; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Este producto consiste en la fusión quimérica de la NAGLU humana recombinante con el Factor de Crecimiento *Insulin-like Growth Factor 2* humano truncado (rhNAGLU-IGF2). Estos estudios han puesto de manifiesto una reducción de la acumulación de HS en el LCR y una estabilización del cociente de desarrollo (Cleary, 2019). Sin embargo, este tipo de terapias conllevan un riesgo de infección asociado a la presencia de un catéter permanentemente conectado al encéfalo. Además, requiere de inyecciones periódicas, lo que comporta la hospitalización frecuente de los pacientes.

#### **4. TERAPIA GÉNICA *IN VIVO* MEDIADA POR VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS**

Frente a las claras limitaciones que presentan las terapias actuales para el tratamiento del Síndrome de Sanfilippo B, es necesario desarrollar nuevas estrategias capaces de superarlas. La terapia génica supone una atractiva alternativa que, con los



años, ha ido demostrando ser más eficaz para el tratamiento de las LSDs (Sawamoto 2018). Para estas enfermedades (y la mayoría de enfermedades monogénicas), la terapia génica consiste en la administración de la copia corregida del gen mutado con el objetivo de restaurar su correcta funcionalidad y revertir la patología en los pacientes (Naldini, 2015).

Hasta la fecha, diversas aproximaciones de terapia génica *in vivo* con vectores virales se han probado en el modelo murino de la MPSIIIB (Fu, 2011, Ribera, 2015).

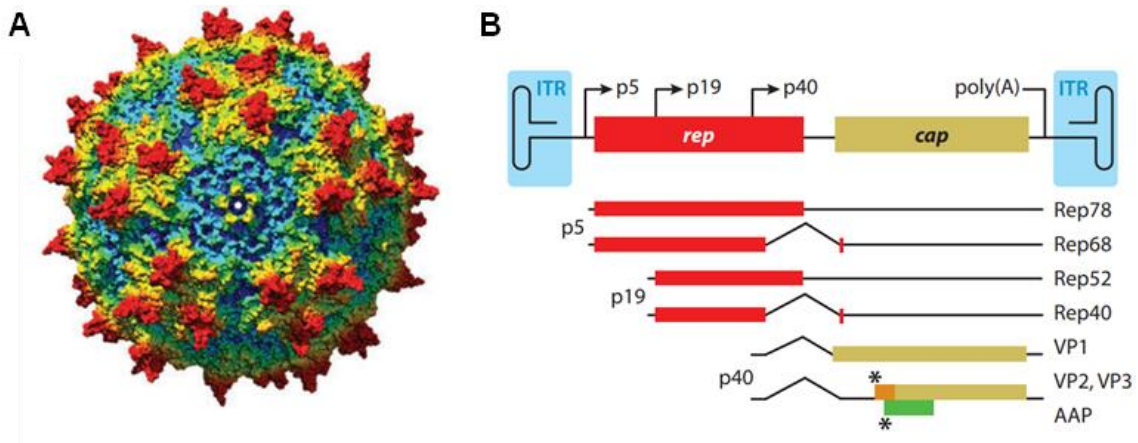
La terapia génica mediada por vectores virales utiliza las propiedades infectivas de los virus de los que derivan para introducir el DNA en las células diana. De las cualidades distintivas de esta terapia génica se pueden destacar la especificidad de unión a receptores, determinando el órgano, tejido o célula diana, su elevada eficiencia de transducción y la capacidad de expresión génica a largo plazo (Mingozzi and High, 2011). Esta expresión a largo plazo, junto con la posibilidad de la secreción de los productos génicos al torrente sanguíneo y su posterior difusión al resto del organismo, hacen de la terapia génica una aproximación de gran utilidad para el tratamiento tanto de las distintas MPSs como para la mayoría de enfermedades hereditarias monogénicas. Actualmente, los vectores virales derivados de los virus adenoasociados (AAV: *Adeno-associated virus*) son los más utilizados en la mayoría de estrategias de terapia génica *in vivo*. Ello es debido a que los AAV no son patogénicos, presentan baja inmunogenicidad, un marcado perfil de seguridad y capacidad de mediar la expresión del transgén que portan durante años en una amplia variedad de tejidos (Mingozzi and High, 2011; Duan, 2018).

Los AAV pertenecen a la familia *Parvoviridae* del género *Dependovirus*. Su descubrimiento se produjo como presencia contaminante en preparaciones de Adenovirus (Atchison, 1965; Hoggan, 1966). Como el nombre de su género indica, son virus dependientes, pues necesitan de la coinfección de virus accesorios para completar su ciclo replicativo. Estos virus “ayudantes” (*helper*) pueden ser de la familia *Herpesviridae* o *Adenoviridae* (Lentz, 2012). Debido a la baja inmunogenicidad que presentan los AAV y a que no causan infecciones en humanos, los vectores derivados de ellos son seguros y tienen asociada una baja probabilidad en la aparición de efectos secundarios nocivos tras su administración. Sin embargo, el 70% de la población presenta anticuerpos neutralizantes contra la cápside de uno o más serotipos de AAV, lo que sí podría ser una limitación a la hora de usar los vectores derivados de estos AAV en alguna terapia. La presencia de dichos anticuerpos neutralizantes en la población

podría disminuir la biodistribución del vector y la capacidad infectiva *in vivo*, disminuyendo, consecuentemente, el efecto terapéutico del tratamiento.

La estructura de los AAV salvajes consiste en una cápside icosaédrica de 25 nm de diámetro sin envuelta lipídica que contiene un genoma lineal de cadena simple de DNA de, aproximadamente, 4,7 kb de longitud (**Figura 8A**) (*Samulski, 2014*). Estos virus son muy estables, pues resisten una breve exposición a elevadas temperaturas, pH ácidos y proteasas. El genoma de estos virus está flanqueado por secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITRs: *Inverted Terminal Repeats*) de 145 pb y una compleja estructura en “forma de T” (**Figura 8B**). Ambas ITRs constituyen sendos orígenes de replicación del genoma viral y son la principal señal de empaquetamiento. Estas secuencias son las únicas activas en *cis* en el DNA viral y son necesarias para generar nuevas partículas víricas. Además, el genoma de los AAV contiene 3 marcos abiertos de lectura (ORF: *Open Reading Frame*) que codifican para las proteínas funcionales del genoma viral. El ORF de rep codifica para 4 proteínas Rep (Rep40, Rep52, Rep68 y Rep 78), las cuales se sintetizan a partir de los mRNAs iniciados en los promotores p5 y p19 (**Figura 8B**). Las actividades endonucleasa, DNA helicasa y ATPasa de las dos proteínas más grandes (Rep68 y Rep78) son necesarias para la función de replicación del DNA viral. Mientras que las otras dos proteínas más pequeñas (Rep40 y Rep52), sólo contienen el dominio helicasa presente en las proteínas Rep más grandes y son necesarias para empaquetar el DNA en la cápside del AAV.

Las 3 proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) están codificadas en el gen *cap*. Gracias al proceso de *splicing*, se forman a partir de un mismo mRNA que se transcribe a partir del promotor p40. Las 3 proteínas presentan la misma secuencia aminoacídica, pero las VP1 y VP2, además, contienen secuencias adicionales en el extremo N-terminal necesarias para la infección. La proporción de las proteínas VP1:VP2:VP3 en la cápside vírica es, aproximadamente, 1:1:10. Asimismo, el mRNA de VP2/VP3 codifica para una proteína activadora de ensamblaje (AAP) a partir de un ORF diferente. Esta AAP, a pesar de no estar presente en la cápside vírica madura, promueve el ensamblaje y la maduración de ésta (**Figura 8B**) (*Samulski, 2014*).



**Figura 8. Representación gráfica esquematizada de la estructura de un AAV. (A)** Imagen en 3D de la cápside de un AAV generada por cristalografía a partir de un AAV2. **(B)** Mapa del genoma de un virus AAV WT. Se representan los genes codificantes (*rep* y *cap*) así como los promotores específicos. Las estructuras en “forma de T” que flanquean el genoma se corresponden con las ITRs, necesarias para el proceso de empaquetamiento del genoma viral. Los asteriscos indican los distintos ORF a partir de los que se codifican la VP2, VP3 y AAP, respectivamente. Adaptado de (Samulski, 2014).

Se han descrito distintos serotipos de AAV con distinto tropismo, el cual viene determinado por las proteínas de la cápside. Son estas proteínas las que confieren la capacidad de unión específica al receptor. A lo largo de la historia, se han descrito diversos serotipos de AAV humanos (serotipos 1, 2 y 5) y de primates (serotipos 7, 8, 9 y rh10), aunque recientemente se han obtenido nuevos serotipos en el laboratorio mediante la combinación de los existentes con el fin de aumentar el tropismo por diferentes tejidos (Gao 2002; Gao, 2005; Belur, 2020).

A pesar de que el mecanismo exacto por el cual se da el tráfico de las partículas víricas desde el medio extracelular al interior del núcleo no se conoce por completo, parece ser que algunos serotipos pueden internalizarse por medio de endocitosis en vesículas revestidas con clatrina (Schultz, 2008). Una vez en el núcleo celular, gracias a la maquinaria enzimática de la propia célula (Nash, 2008) y a las 4 proteínas Rep expresadas a partir del genoma viral, se lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria de DNA (Im, 1992).

#### 4.1. Producción de los vectores AAV recombinantes

En la producción de vectores virales derivados de los AAV es esencial eliminar los genes codificantes para las proteínas Rep y Cap del genoma viral (aproximadamente el 96% del genoma viral), pero se debe mantener ambas secuencias ITR, pues son

necesarias para la posterior encapsidación del DNA. Estos genes se pueden sustituir por un constructo de expresión que contenga el gen de interés y otros elementos necesarios para la expresión proteica (Büning, 2003). Al igual que en el genoma WT, dicho constructo de DNA (incluyendo las ITRs) no debe superar el máximo de 4,7 kb. Este constructo puede contener, a parte del gen de interés, un promotor y la secuencia de poliadenilación (PolyA), necesarios para la correcta expresión de dicho gen (Figura 9) (Samulski, 2014). El genoma del AAV2, uno de los serotipos mejor caracterizados, suele ser el más empleado para la producción de vectores virales empleados en estudios de terapia génica (Samulski 1982; Srivastava 1989; Samulski, 2014).

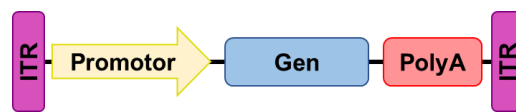
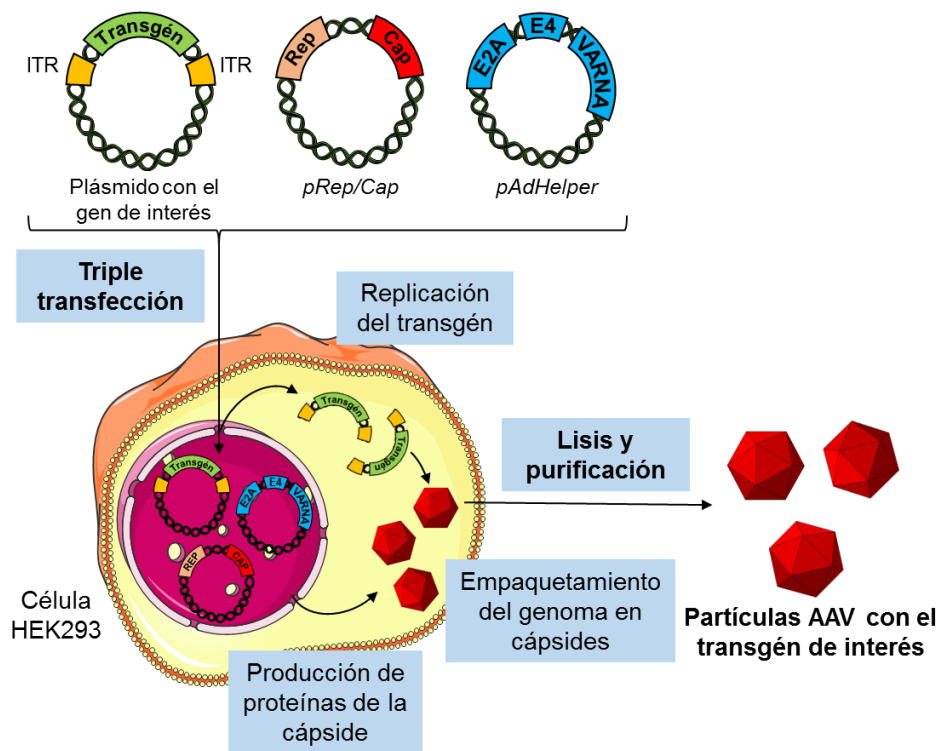


Figura 9. Estructura del constructo de expresión flanqueado por las ITRs de los vectores AAV.

A pesar de que se han descrito respuestas inmunes contra las cápsides de vectores derivados de AAVs en humanos, el hecho de reemplazar los genes virales por otros genes hace que la respuesta inmune contra las células transducidas se reduzca notablemente (Manno 2006; Mingozzi 2009).

Antiguamente, la producción de los vectores derivados de los AAV se llevaba a cabo mediante el empleo de un virus auxiliar, lo que provocaba cierto grado de contaminación por parte de éste en las preparaciones virales. Este problema se solucionó con la implementación del sistema de la triple transfección de cultivos celulares. Este sistema es el más utilizado para la producción de vectores derivados de los AAV y permite aportar las proteínas del virus auxiliar mediante determinados plásmidos (Wang, 2019). De tal manera que se lleva a cabo la transfección con un plásmido con el constructo de expresión flanqueado por las ITRs, otro que contiene los genes auxiliares del adenovirus (E1, E2A, E4 y VA) y un tercer plásmido que contiene los genes rep y cap de los virus AAV (Figura 10). Tras la cotransfección de los 3 plásmidos en células HEK-293, se produce la encapsidación del constructo de expresión en las cápsides víricas (Büning, 2003; Lai, 2010; Wu, 2010). Combinando los genes cap de diferentes serotipos de AAV con el gen rep del AAV2 se puede modificar el tropismo de los vectores generados (Rabinowitz 2002; Grimm 2008).

Posteriormente, se separan las partículas virales de los restos celulares. Existen diversos métodos de purificación de vectores derivados de AAV, siendo la centrifugación con el gradiente de cloruro de cesio (CsCl) un método eficiente para separar cápsidas vacías de cápsidas llenas (contienen genomas) en las producciones de AAV para los estudios preclínicos (Ayuso 2010). Este método, utilizado en nuestro laboratorio, emplea el polietilenglicol (PEG) para precipitar y la ultracentrifugación en gradientes de CICs para la posterior purificación. Gracias a ello, se aumenta la pureza de las preparaciones virales, ya que se reduce significativamente la presencia de cápsidas vacías y de impurezas de DNA y/o proteínas. Esta mayor pureza de las preparaciones permite aumentar la eficiencia de transducción *in vivo* (E. Ayuso 2010).



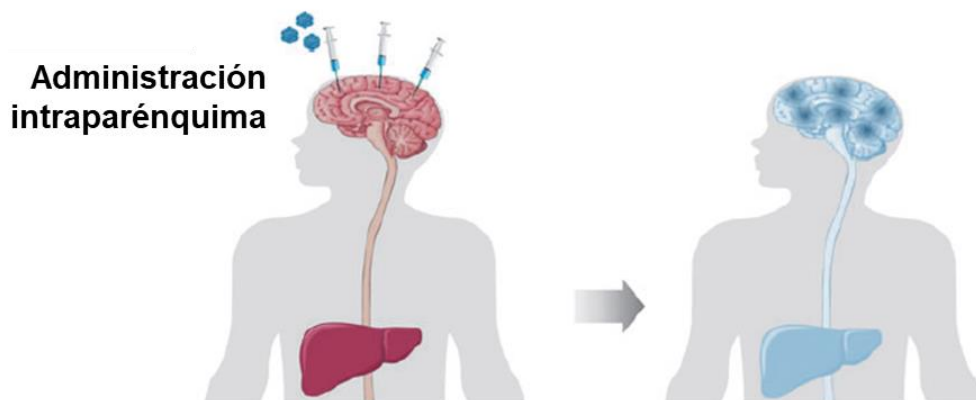
**Figura 10. Producción de vectores AAV por el sistema de triple transfección en células.** Para la producción de vectores derivados de los AAV se transfectan células HEK-293 con tres plásmidos. Un plásmido contiene únicamente el constructo con el gen de interés flanqueado por las secuencias-señal de empacotamiento (ITR). Un segundo plásmido que contiene las secuencias que codifican para las proteínas Rep y Cap y las aportará de manera *trans* y el tercer plásmido, *pAdHelper*, que aporta las funciones propias de un virus auxiliar necesarias para la producción de los vectores AAV. Tras la replicación del DNA de interés y su posterior empaquetamiento en las cápsides, las partículas de vectores virales se purifican a partir del lisado celular para obtener vectores terapéuticos para estudios de terapia génica. Adaptado de (Ayuso, 2010).

#### 4.2. Terapia génica *in vivo* con vectores AAV para la MPSIIIB

Dadas las ventajas que presentan los vectores AAV, diversas aproximaciones de terapia génica se han llevado a cabo en estudios preclínicos y clínicos con el objetivo de revertir las alteraciones de la MPSIIIB. En ellos, se han estudiado diversas rutas de administración de estos vectores virales para conseguir la máxima transducción del SNC, el principal órgano afectado en esta enfermedad.

#### 4.2.1. Administración de vectores AAV al parénquima cerebral

Con el fin de tratar directamente el SNC, existen estudios que implementan la administración de los vectores AAV por medio de la inyección intraparenquima cerebral. El mayor inconveniente que presenta esta técnica es la baja difusión por parte de los vectores AAV desde el punto de inyección al resto del SNC, por lo que se requiere del depósito de pequeños volúmenes de vector en distintos sitios del cerebro (*Tardieu, 2014 y 2017*) (**Figura 11**).



**Figura 11. Administración intraparenquima de vectores AAV.** La inyección intraparenquima requiere de múltiples inyecciones directamente al parénquima cerebral. La difusión de los vectores AAV por el SNC mediante esta ruta de administración es limitada y la concentración de partículas disminuye con la distancia al punto de inyección. La enzima corregida se expresa localmente en las células transducidas por el vector, pero la liberación de ésta al LCR es baja. Además, también se observa muy baja transducción de órganos periféricos como el hígado. Adaptado de *Marcó, 2019*.

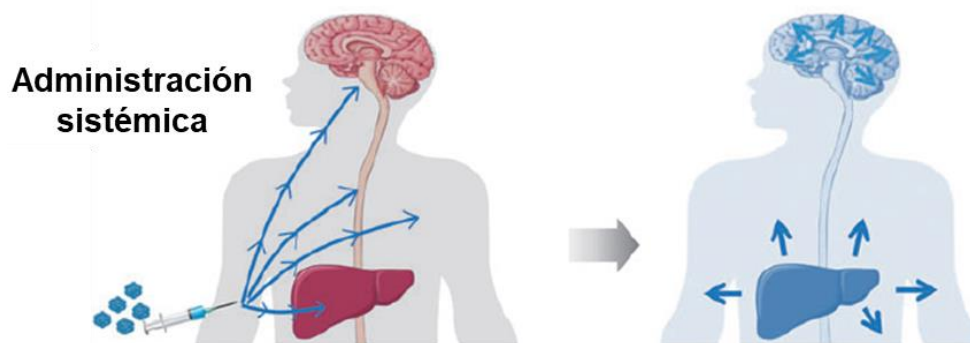
La administración intraparenquima consiste en múltiples inyecciones directamente al parénquima cerebral mediante 6-8 trepanaciones, donde los vectores se depositan a dos niveles en cada inyección. La difusión de los AAV por el SNC mediante esta ruta de administración es limitada, pues existe una alta concentración de genomas virales en el punto de inyección que va disminuyendo con la distancia. Las células adyacentes al

punto de administración se pueden corregir por la expresión local de la enzima, pero la liberación de ésta al LCR es baja. Además, la transducción de órganos periféricos, como el hígado, también es muy baja (Marcó, 2019).

Existen estudios preclínicos en perros que demuestran que la administración intraparáncima cerebral de vectores recombinantes AAV5 codificantes para la NAGLU humana conseguía una disminución del contenido de GAGs en el cerebro, sin llegar a normalizarlo (Ellinwood, 2011). No obstante, la compañía *UniQure Biopharma B.V.*, en colaboración con *Venn Life Sciences* y el Instituto *Pasteur*, inició un estudio clínico en fase 1/2 en el que se administraba en el parénquima cerebral un vector recombinante AAV5 codificante para la NAGLU humana (rAAV2/5-hNAGLU) (NCT03300453; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Cuatro pacientes de MPSIIIB fueron tratados con esta aproximación juntamente con inmunosupresión. Los resultados del estudio mostraron una buena tolerabilidad del procedimiento, niveles de enzima NAGLU en el cerebro, claras mejoras neurocognitivas y niveles de actividad NAGLU en el LCR lumbar alrededor del 15-20% respecto a individuos sanos. Sin embargo, la inmunosupresión crónica mostraba visibles inconvenientes (Tardieu, 2017).

#### **4.2.2. Administración intravascular de vectores AAV**

La ruta de administración sistémica es la menos invasiva para el tratamiento de enfermedades con afectación del SNC, pues explota la habilidad de ciertos serotipos de AAV (como el AAV9) de cruzar la BHE y transducir el cerebro (**Figura 12**) (Foust, 2009; Duque, 2009). Además, esta técnica permite transducir de manera eficiente los tejidos periféricos, especialmente el hígado, dependiendo del serotipo de AAV empleado. El AAV9 ha demostrado ser el serotipo con la capacidad de cruzar la BHE y transducir eficientemente el SNC. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este procedimiento es la dificultad de transducir todo el SNC tras la administración intravenosa (IV) de los vectores AAV si no se administran a dosis muy elevadas.



**Figura 12. Administración sistémica de vectores AAV.** La administración intravenosa es una técnica no invasiva que transduce eficientemente los tejidos periféricos, especialmente el hígado, dependiendo del serotipo de AAV empleado. Entre ellos, el AAV9 ha demostrado la capacidad de cruzar la BHE y transducir eficientemente el SNC. Adaptado de *Marcó, 2019*.

Se han llevado a cabo estudios preclínicos con administración IV de vectores AAV9 codificantes para la NAGLU humana en ratones MPSIIIB y primates no humanos sanos (*Fu, 2011; Murrey, 2014*). El estudio del modelo murino mostraba que se conseguía una reducción de la neuroinflamación y del contenido de GAGs en el cerebro, así como una corrección de las alteraciones del comportamiento (*Fu, 2011*).

Basándose en los resultados obtenidos en estudios preclínicos, la compañía *Abeona Therapeutics* ha iniciado un estudio clínico en pacientes sobre la escalabilidad de dosis de la administración IV del vector recombinante AAV9 codificante para la NAGLU humana bajo el control transcripcional del promotor CMV (rAAV9-CMV-hNAGLU) (NCT03315182; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Todos los pacientes están recibiendo inmunosupresión concomitante y se dividieron en 2 cohortes. Una de ellas está siendo administrada con la dosis de  $2 \times 10^{13}$  vg/kg y la otra, con la de  $5 \times 10^{13}$  vg/kg.

El principal inconveniente que se observa en los estudios que emplean la administración IV son las dosis tan elevadas que se deben administrar para conseguir un efecto terapéutico a nivel del SNC (*Fu, 2011; Flanigan, 2018*). A pesar de que se ha observado efecto terapéutico tras la administración sistémica de vectores AAV9 en humanos (*Flanigan, 2018*), puede que esta ruta no sea la más apropiada para pacientes seropositivos para anticuerpos neutralizantes contra las cápsides de algunos serotipos de AAV. Ello podría limitar la eficacia de la terapia génica *in vivo* tras la administración IV (*Scallan, 2006*). La exposición a elevadas dosis de vectores AAV deriva en la presentación de respuesta inmune frente a las cápsides víricas (*Mingozi, 2011*).

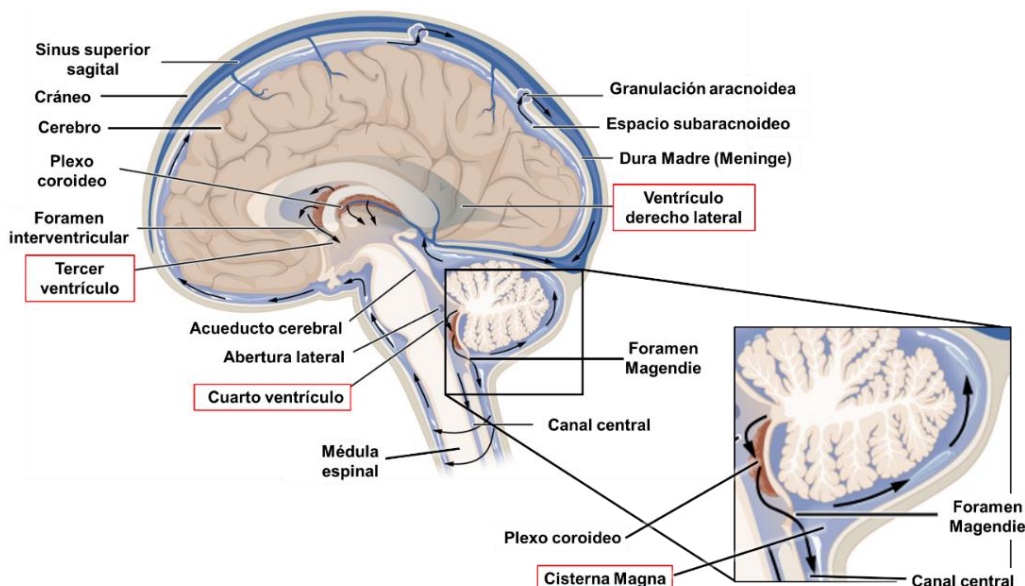
Por ello, una posible alternativa a las administraciones intraparénquima e intravascular podría ser la de administrar los vectores virales directamente al LCR, pues



la circulación de éste es análoga entre humanos y ratones, permitiendo estudiar el efecto de las terapias sobre los modelos murinos y extrapolar los resultados a la especie humana. El objetivo de esta alternativa no es sólo solventar las limitaciones que presenta la BHE, sino maximizar los beneficios terapéuticos minimizando la dosis administrada.

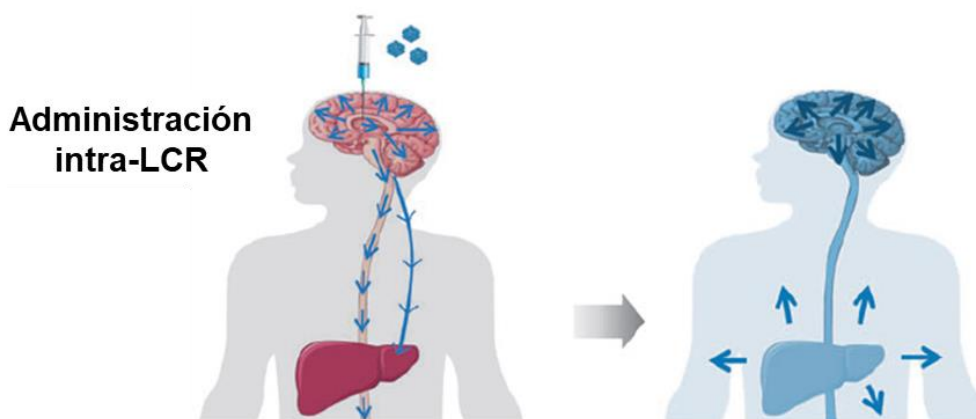
#### 4.2.3. Administración de vectores AAV al LCR

El LCR circula libremente por los ventrículos cerebrales, por el canal central de la médula espinal y por el espacio subaracnoideo (**Figura 13**). El LCR es producido por los plexos coroideos localizados en los 4 ventrículos cerebrales. Estas estructuras están formadas por una monocapa celular ependimaria y por sus correspondientes vasos sanguíneos y tejido conectivo. De esta manera, cuando el LCR producido en los ventrículos laterales fluye al tercer y cuarto ventrículo, se puede distribuir al canal central de la médula espinal y al espacio subaracnoideo a través del Foramen Magendie. Dicho foramen se comunica directamente con la cisterna magna, una de las 3 aberturas principales del espacio subaracnoideo. La cisterna magna se sitúa entre el cerebelo y la parte dorsal de la médula oblonga (**Figura 13**). Cuando ha alcanzado dicho espacio subaracnoideo, el LCR se distribuye por todo el SNC al bañar todo el encéfalo y la médula espinal. Esto hace que los vectores virales administrados al LCR presenten una mayor distribución por todo el SNC.



**Figura 13. Representación esquemática del encéfalo humano y ampliación del cerebelo y la cisterna magna.** La monocapa de células ependimarias que recubre la parte interna de los 4 ventrículos cerebrales es la responsable de la producción del LCR. Éste, a través del Foramen Magendie y de dos aberturas lateras del cuarto ventrículo, accede al espacio subaracnoideo. A través de las granulaciones aracnoideas, el LCR drena al torrente sanguíneo, concretamente al sinus superior sagital. Adaptado de *Anatomy and Physiology*, an OpenStax resource.

Se ha demostrado la eficacia de la transducción del SNC tras la administración de vectores AAV (sobre todo AAV9) directamente al LCR en diferentes modelos animales (*Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017*). La administración directa al LCR permite la transducción de todo el SNC, ya que los vectores se administran al fluido que baña tanto la médula espinal como el encéfalo (**Figura 14**) (*Haurigot, 2013; Sorrentino, 2016*). Además, se ha observado transducción eficiente del SNC tras la administración intra-LCR de dosis bajas en comparación con la administración IV (*Gurda, 2016; Sorrentino, 2016*).



**Figura 14. Administración intra-LCR de vectores AAV.** La administración de vectores AAV9 directamente al LCR a través de la cisterna magna permite una amplia y homogénea distribución de los vectores por el SNC gracias a que el LCR lo baña por completo. La eficiente transducción del hígado mediada por la proporción de vectores que pasan a la circulación tras su administración al LCR permite la disponibilidad de enzima hepática circulante Adaptado de *Marcó, 2019*.

La principal ventaja de la administración intra-LCR de vectores AAV a pacientes de MPSIIIB es la combinación de que esta ruta de administración permite que las células transducidas puedan secretar la proteína deficitaria al LCR y que ésta llegue a todo el SNC y que en las MPSs no es necesaria la transducción de todos los tejidos afectados, pues el mecanismo de “corrección-cruzada” permite la reversión de las alteraciones derivadas de la enfermedad (*Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017*). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que, tras la administración intra-LCR del vector AAV9 codificante para la proteína NAGLU murina a ratones MPSIIIB, una parte de estos vectores pasaba al torrente circulatorio y transducía eficientemente el hígado, lo que permitía la secreción de enzima hepática al torrente circulatorio (*Ribera, 2015*). En la mayoría de los estudios preclínicos para las distintas MPSs, la administración intra-LCR fue a través de la cisterna magna, un

ensanchamiento del espacio subaracnoideo entre la parte caudal del cerebelo y la medula oblonga (**Figura 13**). En este espacio se encuentra el LCR que baña todo el SNC, permitiendo así la distribución de los vectores administrados. Sin embargo, en la práctica clínica pediátrica no se emplea la cisterna magna como punto de administración al LCR, pues la cisterna magna en los humanos presenta un tamaño relativamente menor en comparación con la de los animales, lo que supondría un riesgo añadido en caso de inyectar erróneamente. Por tanto, como alternativa, la práctica en humanos más estandarizada es la administración al LCR vía los ventrículos laterales. No obstante, otra de las ventajas que supone la administración de vectores directamente al LCR es que la eficacia terapéutica no se ve comprometida por la presencia de anticuerpos neutralizantes circulantes (*Haurigot, 2013; Ribera, 2015*).

#### **4.2.4. Terapia génica *in vivo* para la MPSIIIB mediante la administración de vectores AAV9 al LCR**

En nuestro laboratorio, se ha estudiado el desarrollo de una aproximación de terapia génica para la MPSIIIB que consistía en una única administración vía cisterna magna directamente al LCR de vectores AAV9 que contenían un constructo de expresión de la NAGLU murina bajo el control transcripcional del promotor ubicuo CAG (promotor híbrido *chicken  $\beta$ -actin* y potenciador CMV – Citomegalovirus –) a la dosis de  $3.0 \times 10^{10}$  vg (*Ribera, 2015*). Esta aproximación demostró una recuperación de los niveles de actividad enzimática NAGLU a nivel del SNC y periférico, lo que conllevó la normalización del contenido de GAGs cerebrales y, gracias a la transducción del hígado, donde se produjo un incremento de la producción enzimática, la NAGLU circulante permitió la corrección del acúmulo de GAGs en la mayoría de los tejidos periféricos. Además, la corrección de la patología neurológica y la neuroinflamación venían acompañadas de la reversión de las alteraciones del comportamiento y del aumento en la esperanza de vida de los animales MPSIIIB tratados (*Ribera, 2015*). Asimismo, la administración de vectores AAV9 codificantes para la NAGLU canina en perros sanos, presentaran o no anticuerpos neutralizantes contra la cápside del AAV9 preexistentes a la administración del vector, demostró que se alcanzaban niveles enzimáticos muy similares entre ambos grupos, poniendo de manifiesto que la eficacia terapéutica no se vería comprometida en aquellos pacientes seropositivos para el AAV9 (*Ribera, 2015*).

No obstante, en este estudio no se evaluó el efecto de dicha aproximación de terapia génica sobre afectaciones neurosensoriales que alteran las capacidades auditiva y visual de los ratones. Está descrito que, con la edad, los pacientes de la

MPSIIIB desarrollan alteraciones altamente invalidantes que afectan gravemente las funciones auditiva y visual (*Mesolella, 2013; Leung, 1971; Del Monte, 1983*). Además, también se ha demostrado que el modelo murino de la MPSIIIB recapitula las alteraciones auditivas y visuales presentes entre los pacientes de esta enfermedad (*Heldermon, 2007; Tse, 2015*).

Por otro lado, en el estudio de *Ribera, 2015*, se empleó una dosis alta del vector AAV9-*Naglu* ( $3.0 \times 10^{10}$  vg/ratón), por lo que, de cara a la traslacionalidad clínica, se debería evaluar si una dosis más baja del vector resultaría tener el mismo efecto terapéutico, tanto a nivel de las principales alteraciones centrales y periféricas de la MPSIIIB, como de las alteraciones neurosensoriales que afectan a las capacidades auditiva y visual.

## 5. ESTRUCTURAS SENSORIALES

### 5.1. Anatomía y fisiología del oído

El oído, también conocido como órgano vestibulococlear, es una estructura compleja encargada de las funciones de la audición y el equilibrio. El oído se puede dividir en 3 grandes partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno (**Figura 15A**).

El oído externo está formado por la aurícula o *pinna* (comúnmente conocido como oreja), el conducto auditivo externo (*meatus*) y la membrana timpánica, que separa la cavidad del oído externo de la cavidad del oído medio (**Figura 15A**). La principal función de esta parte del oído es la captación de las ondas sonoras transmitidas por el aire, que viajan por el conducto auditivo hasta hacer vibrar la membrana timpánica que comunica con el oído medio.

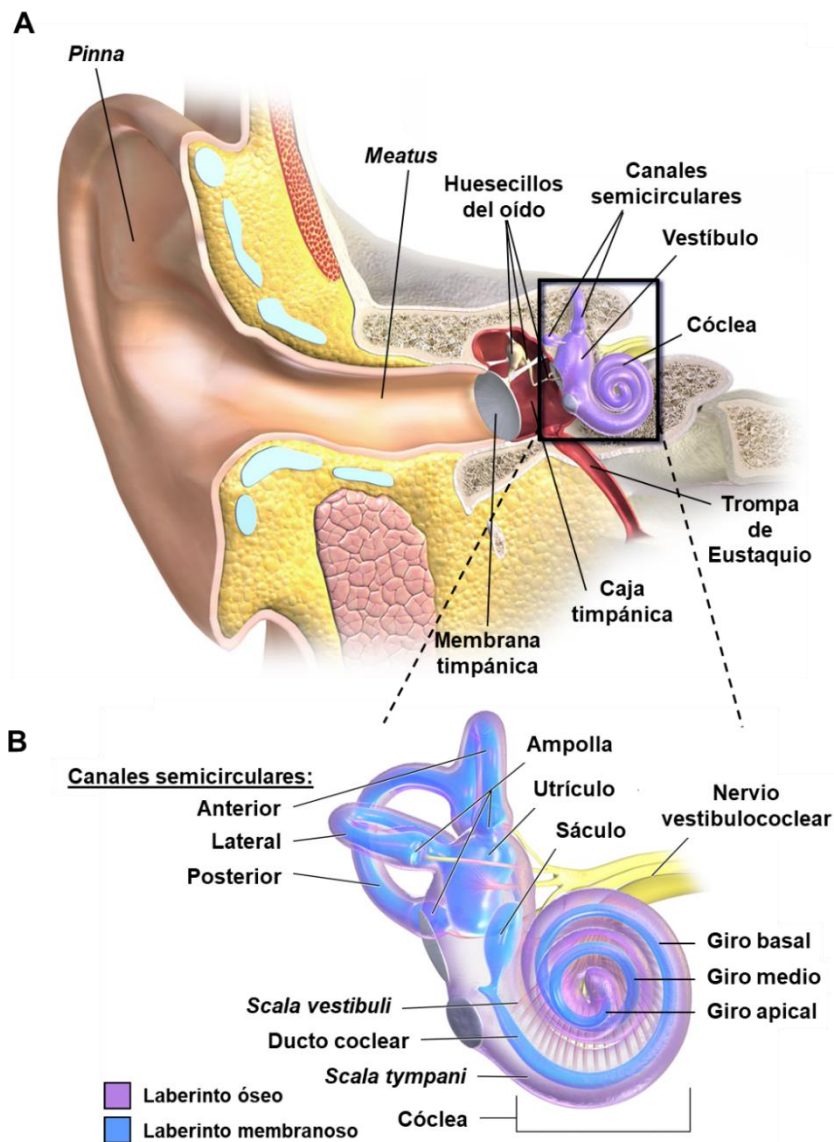
El oído medio lo conforman la caja timpánica, los huesecillos del oído (martillo, yunque y estribo), la trompa de Eustaquio, los músculos de los huesecillos y las celdas mastoideas (**Figura 15A**). El martillo está unido a la membrana timpánica y cuando ésta vibra por las ondas sonoras, hace que éste se mueva, golpeando sobre el yunque. Estos movimientos son transmitidos al estribo, el cual golpea sobre la ventana oval, que comunica el oído medio con el oído interno. La interacción del estribo con la ventana oval genera una serie de fluctuaciones en la perilinfa, el fluido que rellena la parte ósea externa de la cóclea.

El oído interno está formado por los canales semicirculares, el vestíbulo y la cóclea (**Figura 15A**).

El vestíbulo está formado por células ciliadas que forman una estructura llamada mácula y se encarga de estabilizar el equilibrio estático. Esta estructura se puede dividir en 2 grandes partes: el utrículo (parte superior) y el sáculo (parte inferior) (**Figura 15B**). El vestíbulo corresponde con la parte ósea externa rellena de perilinfa, mientras que, tanto el utrículo como el sáculo, se corresponden con la parte interna membranosa rellena de endolinfa (**Figura 15B**). A su vez, el vestíbulo está conectado con los 3 canales semicirculares (anterior, lateral y posterior), estructuras óseas que presentan los ductos semicirculares en su interior (membranosos), donde existen células ciliadas que conforman la estructura del *cristae ampullaris* o ampolla, encargada de mantener el equilibrio dinámico (**Figura 15B**).

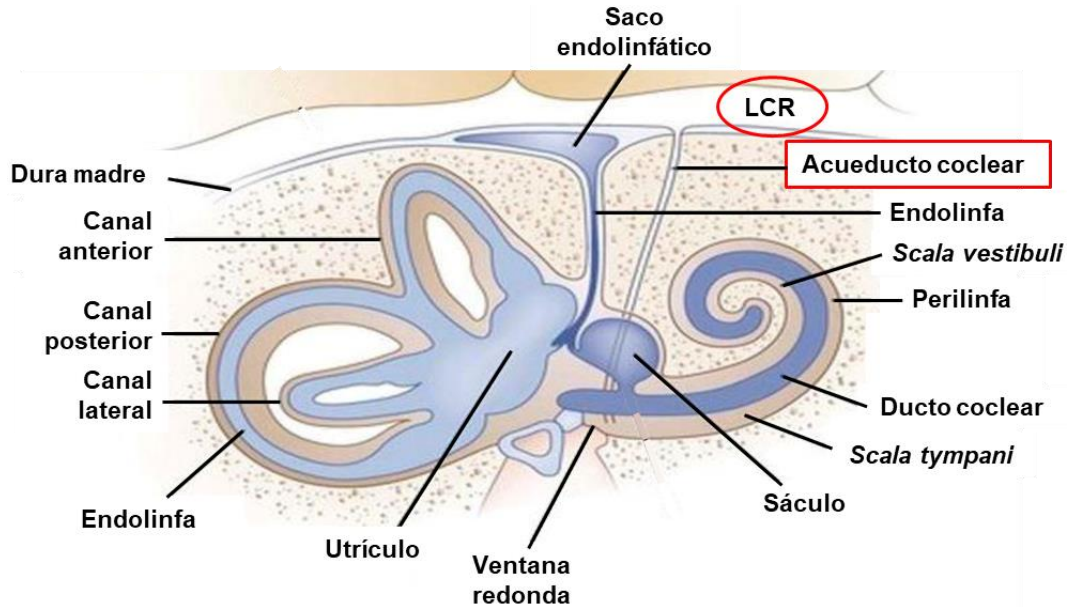
Del vestíbulo se prolongan los nervios que forman la rama vestibular del par craneal VIII o nervio vestibulococlear.

La cóclea es la parte sensorial del oído interno especializada en la detección de las ondas sonoras y en la transmisión del impulso eléctrico que éstas generan hasta el córtex auditivo. Se define como “un tubo dentro de otro tubo”, uno membranoso (ducto coclear) dentro de otro óseo (ducto coclear) dentro de otro óseo y su estructura en forma de caracol da dos giros y medio a una estructura ósea llamada modiolos (**Figura 15B**). La cóclea consta de 3 partes: *Scala vestibuli* (cámara superior), *Scala media* (ducto coclear) y *Scala tympani* (cámara inferior) (**Figura 15B**). La *Scala vestibuli* se corresponde con la parte ósea externa rellena de perilinfa que se comunica directamente con la ventana oval. A través de ésta, se transmiten las ondas sonoras que generan fluctuaciones en la perilinfa.



**Figura 15. Anatomía del oído.** Esquema representativo de las partes del órgano vestibulococlear. **(A)** Representación esquemática del oído donde se señalan las partes que conforman el oído externo, medio e interno. **(B)** Anatomía del oído interno donde se indican las principales estructuras que lo componen.

Cabe destacar que la perilinfa está en contacto directo con el LCR a través del acueducto coclear, el cual drena el LCR directamente a la *Scala tympani* a través de la ventana redonda (**Figura 16**) (Feijen, 2004; Salt, 2015).



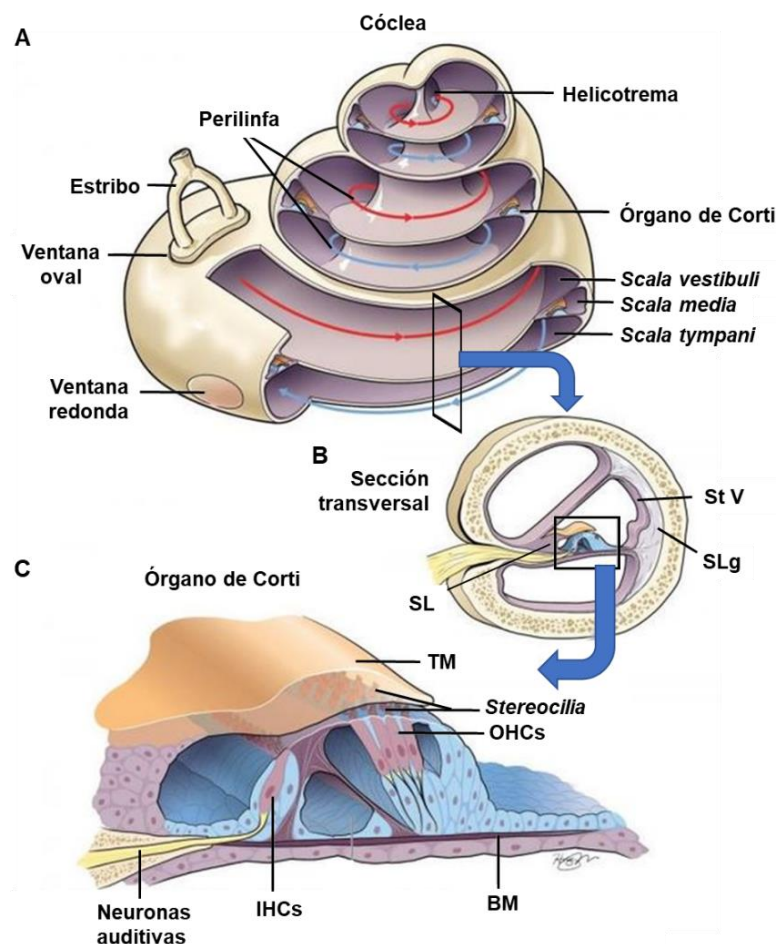
**Figura 16. Representación gráfica de la distribución de los fluidos internos de la cóclea.** La perilinfa y la endolinfa son los fluidos que bañan el interior de la cóclea, pero que no conectan entre sí. El LCR está en contacto directo con la perilinfa a través del acueducto coclear, cuyo drenaje es a través de la ventana redonda. Adaptado de (Azad, 2018).

La *Scala media* es la parte membranosa interna rellena de endolinfa, fluido muy similar en composición al LCR. En ella se encuentran las células ciliadas, células que poseen mecanorreceptores que, junto a otras estructuras y células, forman una estructura llamada órgano de Corti, que es el encargado de transformar las fluctuaciones de fluido en estímulos eléctricos que llegarán al córtex auditivo. La *Scala tympani* también conforma la parte ósea externa rellena de perilinfa y se comunica directamente con el acueducto coclear a través de la ventana redonda. Ésta evita la dispersión de las ondas generadas en el fluido del oído interno. El punto en el que convergen las perilinfas de las cámaras superior e inferior se denomina helicotrema y es el punto final ciego de la cóclea (**Figura 17A**).

En la cóclea se origina la transducción de las ondas sonoras en fluctuaciones de fluido para la transmisión del sonido hasta el cerebro en forma de estímulo eléctrico. Ello es debido, en gran parte, al órgano de Corti. En él, se pueden distinguir diferentes componentes como el limbo espiral (*Spiral limbus* o SL) (proyección ósea del modiol)

compuesta por periostio), la membrana tectorial (*Tectorial Membrane* o TM), las células ciliadas (*Hair Cells* o HCs), la membrana basilar (*Basilar Membrane* o BM), la lámina reticular, las células de soporte, la *Stria Vascularis* (St V) o el ligamento espiral (*Spiral Ligament* o SLg) (conformado también por periostio) (**Figura 17B,C**). Cada una de estas estructuras cumple con una función determinada en el proceso de la transmisión del sonido hasta el córtex auditivo.

La *Basilar Membrane* (BM) está compuesta por fibras elásticas de diferente tamaño y rigidez a lo largo de su extensión. Las fibras más cortas y rígidas se encuentran en la base de la BM (más cerca del SL) y son estimuladas por sonidos de frecuencias elevadas, mientras que las fibras más largas y laxas se encuentran en el extremo de la BM (más cerca del SLg) y son estimuladas por sonidos de bajas frecuencias. Por tanto, la BM oscila de manera diferente a lo largo de la longitud de la cóclea en función de la frecuencia del sonido.



**Figura 17. Anatomía de la cóclea y del órgano de Corti.** Representación esquemática de la cóclea (**A**), de una sección transversal de uno de sus giros (**B**) y del órgano de Corti. En ellas se señalan las principales estructuras que las componen. St V: *Stria Vascularis*, SLg: *Spiral Ligament* o ligamento espiral, SL: *Spiral Limbus* o limbo espiral, TM: *Tectorial Membrane* o membrana tectorial, BM: *Basilar Membrane* o membrana basilar OHCs: *Outer Hair Cells*, IHC: *Inner HAir Cells*.



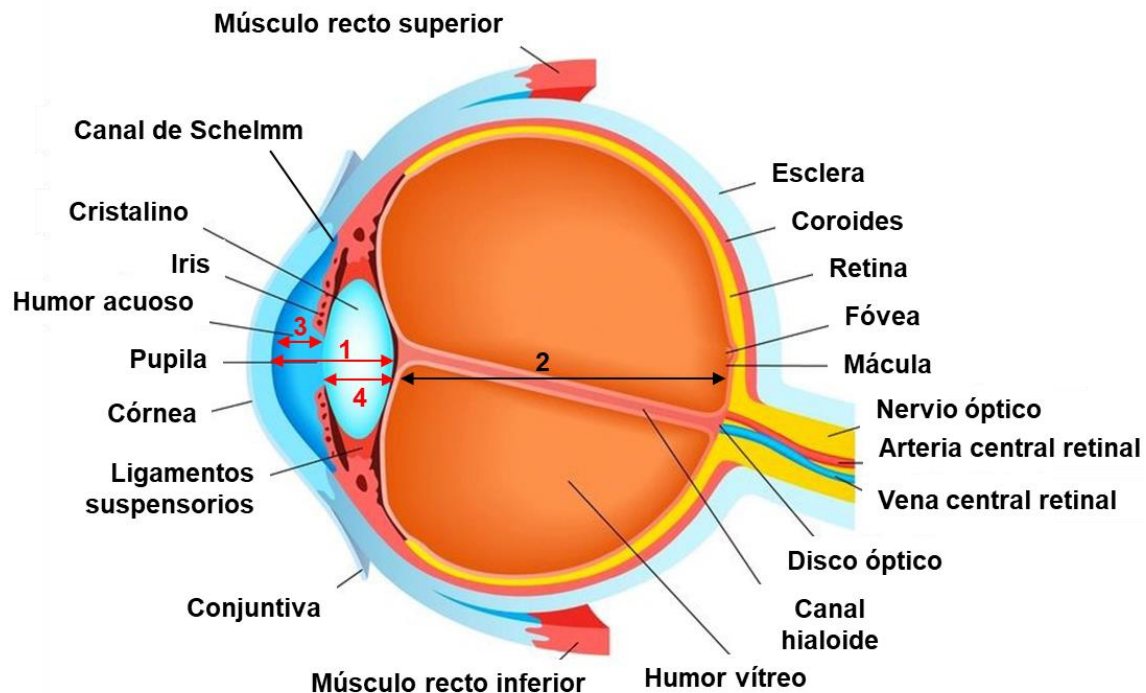
Existen dos tipos de células ciliadas (HCs): las internas o *Inner Hair Cells* (IHCs) y las externas o *Outer Hair Cells* (OHCs). Las IHCs son las primeras en reaccionar al estímulo sonoro percibido y se encuentran dispuestas en una única fila a lo largo de toda la extensión del órgano de Corti (**Figura 17C**). El 95% de las extensiones neuronales del ganglio espiral conecta con las IHCs. El ganglio espiral está formado a partir del otocisto primitivo, una vesícula auditiva compuesta por neuronas bipolares. El 5% restante de estas conexiones se da con las OHCs. Éstas se disponen en 3 filas a lo largo del órgano de Corti y son las responsables de la modulación del proceso auditivo (**Figura 17C**). Es decir, de modular la generación de potenciales de acción en función de la frecuencia y amplitud de las ondas sonoras. Los cilios de las HCs (*stereocilia*) son los encargados de generar los potenciales de acción mediante su movimiento que a su vez es debido a las fluctuaciones de la endolinfa producidas por las ondas sonoras (**Figura 17C**). Este movimiento depende de las vibraciones generadas por la BM (*White, 2019*).

Por tanto, las ondas sonoras que penetran en el conducto auditivo generan unas fluctuaciones de fluido en la perilinfa que provoca las oscilaciones de la BM. Ésta, en contacto directo con la endolinfa, le transmite dichas fluctuaciones y hace que los cilios de las HCs, ancladas a ella, entren en contacto con la TM. Esto produce la despolarización de la membrana plasmática de las HCs y la generación de potenciales eléctricos que se transmiten hasta el córtex auditivo. Esta transmisión del estímulo eléctrico se da a través de las prolongaciones nerviosas del ganglio espiral que conforman la rama coclear del par craneal VIII. De esta manera, se da lugar a la transducción de las ondas sonoras en potenciales eléctricos hasta el cerebro para dar lugar a la audición.

## 5.2. Anatomía y fisiología del ojo

El ojo es la estructura anatómica por medio de la que se ejerce la función visual. El ojo se divide en tres capas: la capa más externa es la capa fibrosa, que se compone de la esclera y la córnea. La capa intermedia es la capa vascular o úvea y la conforman la coroides, el iris y el cuerpo ciliar. Y la capa más interna se corresponde con la capa sensorial o retina (**Figura 18**). Otro elemento importante es el cristalino, que se encarga de la correcta refracción de la luz que entra en el ojo. El globo ocular, a su vez, se divide en dos segmentos: anterior y posterior (**Figura 18**). El segmento anterior va desde la parte anterior del cristalino hasta la córnea y se puede subdividir en dos cámaras: cámara anterior, desde el iris hasta la córnea; y cámara posterior, desde la parte anterior del cristalino hasta el iris (**Figura 18**). Ambas cámaras están rellenas de humor acuoso.

Por su parte, el segmento posterior se extiende desde la parte posterior del cristalino hasta la retina y está compuesto de humor vítreo.



**Figura 18. Anatomía del ojo.** Representación gráfica de las partes que conforman el ojo. La capa más externa conforma el revestimiento del ojo y está formado por la esclera y la córnea. La úvea está formada por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. Y la parte sensorial se corresponde con la retina, donde se encuentran los fotorreceptores. El abastecimiento sanguíneo del ojo depende tanto de la coroides como de la arteria central retinal. 1: segmento anterior, 2: segmento posterior, 3: cámara anterior, 4: cámara posterior.

La esclera está compuesta por fibras densas de tejido conectivo, colágeno y es una estructura altamente pigmentada. Al ser uno de los revestimientos externos del ojo, mantiene protegidas las estructuras internas del mismo y la forma del globo ocular. Por su parte, la córnea es una estructura avascular y con una alta organización de sus componentes para permitir la correcta refracción de la luz a través de ella hasta llegar a la parte sensorial (retina). Es la barrera física que separa el tejido del aire.

El iris es una estructura muscular altamente pigmentada. Esta pigmentación es la que otorga el color de los ojos. Está compuesto por músculos dilatadores y contráctiles. El orificio que queda entre ambas partes del iris es la pupila, a través de la cual pasa la luz. La contracción o distensión de estos músculos hace que la pupila se contraiga o distienda para que pase mayor o menor cantidad de luz al interior, ejerciendo de diafragma.

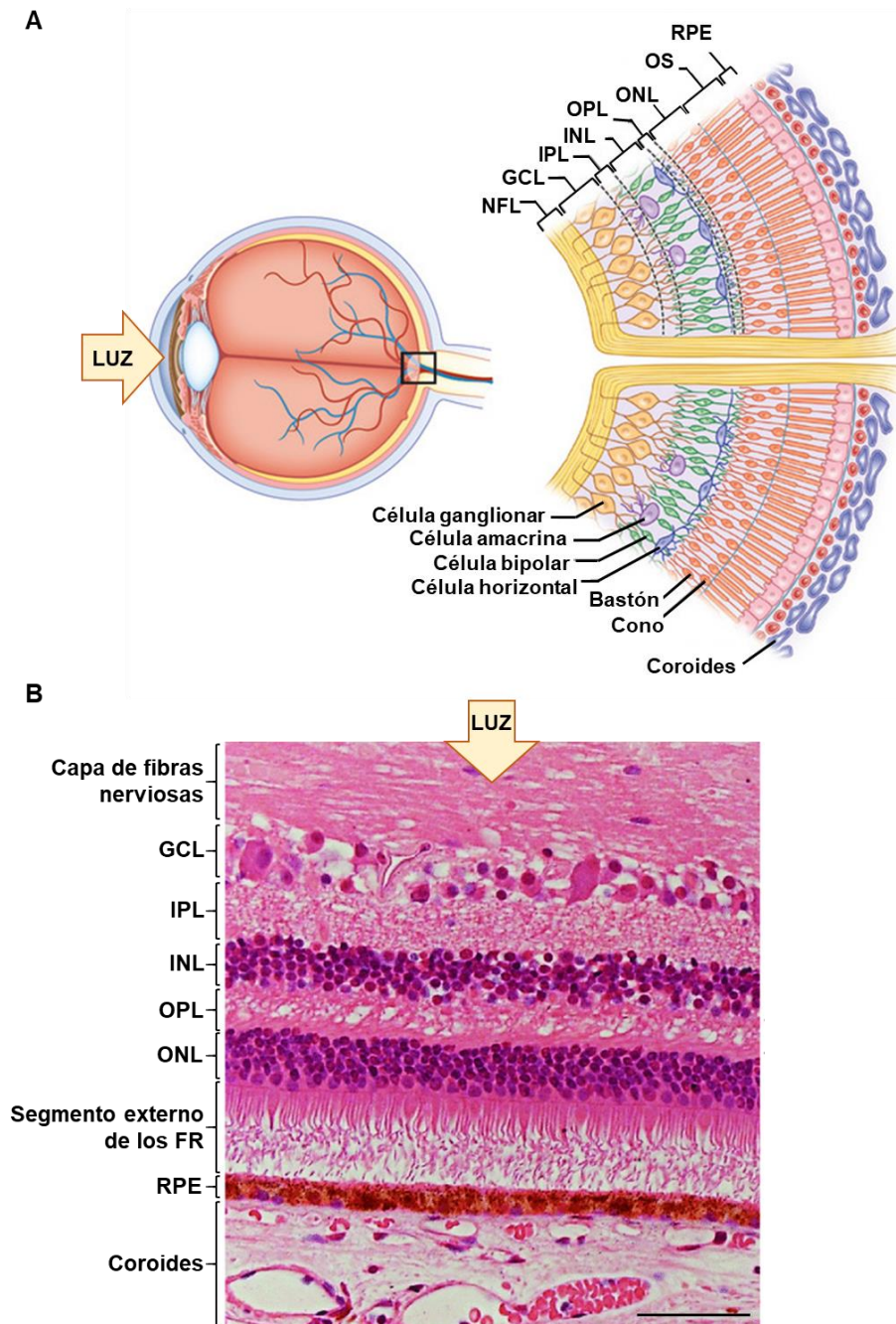
El cuerpo ciliar está compuesto por los músculos ciliares y un epitelio celular llamado proceso ciliar. Los músculos ciliares están conectados al cristalino por medio de los ligamentos suspensorios y permiten la acomodación de éste para la correcta refracción de los rayos de luz. Los procesos ciliares son las células encargadas de secretar el humor acuoso gracias a la difusión de componentes desde el torrente sanguíneo. El humor acuoso viaja desde la cámara posterior a la cámara anterior y drena al torrente circulatorio a través de los canales de Schelmm, situados en los límites de la córnea (**Figura 18**).

La coroides es una extensión del cuerpo ciliar y consta de una membrana pigmentada encargada de absorber los rayos de luz reflejados para evitar su dispersión y permitir una visión correcta. Esta estructura está altamente vascularizada y provee de nutrientes a otras estructuras del ojo.

Por su parte, el cristalino consiste en una cápsula cubierta de un epitelio altamente organizado y avascular que permite una visión correcta. En los ratones, el cristalino presenta una forma más esférica que en los humanos y ocupa la mayor parte de la cavidad vítrea (*Sundin, 2005; Ruberte, 2016*). En cuanto al humor vítreo, es un fluido gelatinoso cuya cantidad es fija a lo largo de toda la vida del individuo. Está compuesto, en su mayoría, de agua, GAGs y ácido hialurónico. Ocupa la cavidad vítrea o segmento posterior del ojo y, entre sus funciones, se destaca el mantenimiento de la presión intraocular, la transmisión de los rayos de luz hasta la retina y el mantenimiento de la unión de las capas de la retina. Cabe destacar que, en proporción, la cavidad vítrea es mayor en humanos que en ratones.

La retina es la capa sensorial del ojo y está compuesta por neuronas y un epitelio pigmentado que la nutre gracias a la vascularización proporcionada por la coroides (**Figura 19**). La retina se compone de diversas capas: el RPE (*Retinal Pigment Epithelium* o epitelio pigmentario retiniano), la ONL (*Outer Nuclear Layer* o capa nuclear externa), La OPL (*Outer Plexiform Layer* o capa plexiforme externa), la INL (*Inner Nuclear Layer* o capa nuclear interna), la IPL (*Inner Plexiform Layer* o capa plexiforme interna) y la GCL (*Ganglion Cell Layer* o capa de células ganglionares) (**Figura 19**). El RPE consiste en un epitelio pigmentado que contiene melanina, encargada de prevenir la reflexión de la luz mediante la absorción de sus rayos. Además, esta monocapa celular nutre la parte más externa de la retina mediante la difusión de moléculas desde los vasos sanguíneos con los cuales está en contacto a través de la coroides. También, ejerce de barrera, impidiendo el paso de ciertas moléculas desde el torrente sanguíneo hasta la retina (**Figura 19**). La ONL está compuesta por los núcleos de los

fotorreceptores, las células pigmentadas encargadas de la absorción de los rayos de luz y del inicio de la cascada de fototransducción por el cual se transforma el estímulo luminoso en estímulo eléctrico que llega al córtex visual (**Figura 19**). Existen dos tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones (**Figura 19A**). Los conos son los responsables de la visión fotópica (visión en condiciones de alta luminosidad). Estas neuronas se encargan de la detección del color, de la forma definida de los objetos y de la agudeza visual. Estas células contienen el pigmento fopsina, del cual hay tres tipos: fopsina I, II y III. Estos pigmentos se encargan de la captación de diferentes longitudes de onda del espectro visible para diferenciar 3 colores principales: azul, verde y rojo (de menor a mayor longitud de onda). Estos pigmentos se encuentran en los segmentos externos de los fotorreceptores (**Figura 19**). Por su parte, los bastones son los fotorreceptores responsables de la visión escotópica, es decir, en condiciones de baja luminosidad. Estas neuronas, se encargan de la visión en la oscuridad y la distinción de diferentes tonos de grises. Además, el pigmento específico de este tipo celular es la rodopsina, la cual se compone de retinal (el pigmento *per se*) y opsina (la parte proteica). Este pigmento también se encuentra en el segmento externo de los bastones (**Figura 19**). A pesar de sus diferencias funcionales, ambos tipos de fotorreceptores presentan el mismo proceso de transducción de la luz. Los fotorreceptores están conectados entre sí mediante las células horizontales, un tipo celular cuyas prolongaciones nerviosas se encuentran en la OPL, una capa intermedia entre la ONL y la INL (**Figura 19**). En la INL se encuentran los núcleos de las células bipolares, horizontales y amacrinas. Las células bipolares conectan los fotorreceptores con las células ganglionares de la GCL (**Figura 19**). La conexión de las células bipolares con las ganglionares es a través de las células amacrinas. Los axones y dendritas de las células horizontales y amacrinas se extienden a lo largo de la IPL (**Figura 19**). Finalmente, los axones de las células ganglionares presentes en la GCL son los que conforman el nervio óptico (par craneal II). Tanto la GCL como la INL presentan vascularización, que les permite la llegada de nutrientes a través del torrente sanguíneo. Cabe destacar que en la retina humana se encuentra la mácula, que se encarga de la visión central (**Figura 18**). El resto de la retina se encarga de la visión periférica. En la mácula, se encuentra la fóvea y es la región con mayor concentración de conos de la retina (**Figura 18**). Esta región se encarga de la agudeza visual y es una zona completamente avascular. La retina de los ratones carece de mácula y, por tanto, también de fóvea (*Sundin, 2005*). Además, la retina de estos animales está mejor adaptada a las condiciones de luminosidad nocturna y crepuscular, por lo que la presencia de bastones es mayor que la de conos (*Sundin, 2005*).



**Figura 19. Representación esquemática de la retina y sus capas celulares. (A)** Esquema de la retina y su orientación respecto al globo ocular. En él se señalan las distintas capas de la retina y los tipos celulares que la componen. **(B)** Corte histológico de una retina donde se señalan las distintas capas celulares que la conforman. La capa de fibras nerviosas está compuesta por los axones de las células ganglionares que conforman el nervio óptico. El segmento externo de los fotorreceptores (FR) es donde se encuentran los pigmentos encargados de absorber la luz e iniciar la cascada de fototransducción. GCL: *Ganglion Cell Layer* (capa de células ganglionares), IPL: *Inner Plexiform Layer* (capa plexiforme interna), INL: *Inner Nuclear Layer* (capa nuclear interna), OPL: *Outer Plexiform Layer* (capa plexiforme externa), ONL: *Outer Nuclear Layer* (capa nuclear externa), RPE: *Retinal Pigment Epithelium* (epitelio pigmentario retiniano). La flecha amarilla indica la dirección desde la que incide la luz sobre la retina.

En definitiva, la luz incide sobre el segmento externo de los fotorreceptores (donde se encuentran los pigmentos) y genera la despolarización de las membranas plasmáticas de dichas neuronas, que producen los potenciales eléctricos. Éstos son transmitidos a través de las células bipolares hasta las células ganglionares, cuyos axones conforman el nervio óptico. A través de éste se produce la fototransducción hasta el córtex cerebral para dar lugar a la visión.

## 6. AFECTACIONES NEUROSENSORIALES EN LAS MPSs

Entre los pacientes de las distintas MPSs que presentan alteraciones en el SNC, en algunas de estas enfermedades, como extensión de dicha afectación, con la edad, comienzan a aparecer alteraciones neurosensoriales que afectan a las funciones auditiva y visual (Leung, 1971; Del Monte, 1983; Santos, 2011; Mesollella, 2013; Gökdoğan, 2015).

### 6.1. Afectaciones otológicas

Las afectaciones otológicas se manifiestan de manera clínica a edades tempranas en la mayoría de los pacientes de las distintas MPSs con afectaciones en el oído (Mesollella, 2013). Se ha descrito que esta afectación incluye otitis recurrentes y pérdida auditiva mixta (conductiva y neurosensorial). La hipoacusia conductiva depende de la afectación del oído medio, mientras que la neurosensorial está relacionada con la disfuncionalidad del oído interno. Se atribuye el componente conductivo de la hipoacusia a la presencia de otitis seromucosa, pero no se ha encontrado una justificación tan evidente para el componente neurosensorial (Santos, 2011). Algunas hipótesis postulan que ésta podría deberse al acúmulo de depósitos lisosomales en estructuras cocleares, a la disfunción de las células ciliadas o al acúmulo de GAGs en el SNC, entre otras (Santos, 2011). Se ha descrito que la pérdida auditiva afecta, aproximadamente, al 60-90% de pacientes de MPS (Mesollella, 2013). En estudios llevados a cabo con modelos animales, se han encontrado depósitos lisosomales en células del *Spiral Limbus* y *Spiral Ligament*, entre otros, pero no en el órgano de Corti (Santos, 2011). Tampoco se ha evidenciado pérdida del número de células ciliadas – hallazgo más habitual en cualquier tipo de hipoacusia neurosensorial. Sin embargo, estudios de pacientes MPS con grados de hipoacusia moderado a severo postularon que ésta se debía a la presencia de GAGs en los ductos cocleares, la *Stria Vascularis* y el nervio coclear, lo que impedía un correcto funcionamiento de dichas estructuras (Gökdoğan, 2015). A pesar de estas

diferencias, tanto en los modelos animales como en la clínica, se describía una tendencia a la aparición tardía y progresiva de la hipoacusia (*Santos, 2011*).

## **6.2. Afectaciones oculares**

La patología ocular es común en todas las MPSs y resulta en un deterioro de la capacidad visual (*Ganesh, 2013; Ashwoth, 2006; Summers, 2011*). Las complicaciones oculares incluyen opacidad corneal, degeneración de retina, glaucoma, edema del disco óptico y atrofia del nervio óptico, entre las más frecuentes (*Ganesh, 2013; Ashwoth, 2006; Summers, 2011*). A diferencia de la MPSI, donde las afectaciones en la parte anterior del ojo impiden una correcta visión, en la MPSIII esta situación no es habitual entre los pacientes (*Ganesh, 2013; Ashwoth, 2005*). Aunque la opacidad corneal no suele ser muy significativa en los pacientes del Síndrome de Sanfilippo, su coexistencia con el aumento del espesor de la córnea, unido a los impedimentos físicos e intelectuales de algunos pacientes, dificulta tanto el diagnóstico como el seguimiento de dichas afectaciones oculares. La retinopatía con degeneración de la retina sí que suele manifestarse como un rasgo moderado a severo en algunos pacientes de MPSIII (*Ashwoth, 2006*). Además, esta característica reporta notables cambios en los resultados del electroretinograma (ERG) (*Ashwoth, 2006*). Estos resultados anormales de los ERGs manifiestan que, inicialmente, la respuesta eléctrica de la retina dependiente de los bastones está más severamente afectada que la respuesta que depende de los conos. Además, la reducción progresiva en la amplitud de las ondas del ERG sugiere un deterioro progresivo de la función retiniana (*Ashwoth, 2006; Leung, 1971*). En el caso de esta neurodegeneración y su sintomatología asociada, la progresión es muy lenta y la edad de aparición depende de la severidad del fenotipo (*Summers, 2011*). Además, también se ha descrito que estos pacientes presentan acumulación de GAGs en distintas estructuras oculares, como la córnea, el epitelio del cristalino, la coroides y la esclera, entre otros (*Ashwoth, 2006*).

En pacientes de MPSIII, los resultados histopatológicos del ojo han puesto de manifiesto una marcada pérdida de fotorreceptores sin lesiones observables ni en las células ganglionares ni en el nervio óptico (*Del Monte, 1983*). Esta pérdida de fotorreceptores es lo que conllevaría a la pérdida progresiva de la visión en los pacientes.

Por tanto, la evaluación de la eficacia de una aproximación de terapia génica sobre las alteraciones neurosensoriales que afectan las capacidades auditiva y visual es crucial para encontrar un tratamiento que revierta, de manera eficaz, todas las alteraciones derivadas de la profunda afectación del SNC en los pacientes del Síndrome de Sanfilippo. Por ello, en este trabajo se pretendió continuar con el estudio previamente publicado por nuestro laboratorio (*Ribera, 2015*) estudiando el efecto terapéutico de la administración IC del vector AAV9-*Naglu* en las alteraciones auditivas y visuales del modelo murino de esta enfermedad.





### ***III. Objetivos***



La MPSIIIB es una enfermedad rara de acúmulo lisosomal cuya afectación principal es una severa neurodegeneración y neuroinflamación, acompañada de alteraciones periféricas moderadas. Durante el transcurso de ésta, los pacientes también desarrollan alteraciones neurosensoriales que afectan a las funciones auditiva y visual, provocando una marcada hipoacusia y la pérdida de la visión debido a la degeneración retiniana. La falta de una terapia eficaz aprobada para el tratamiento de esta enfermedad y los recientes estudios sobre la aplicación de terapia génica en modelos animales de la MPSIIB, dejan abierta una puerta al desarrollo de nuevas aproximaciones que permitan contrarrestarla eficientemente y también las alteraciones neurosensoriales que provocan la pérdida de las capacidades auditiva y visual en esta enfermedad.

Con anterioridad, en nuestro laboratorio se demostró la eficacia terapéutica de una aproximación de terapia génica, basada en una única administración IC al LCR de vectores AAV9 codificantes para la enzima NAGLU murina (AAV9-*Naglu*), sobre las afectaciones del SNC y periféricas en el modelo murino de la MPSIIIB (Ribera, 2015). De cara a la traslacionalidad clínica, se requiere maximizar el efecto terapéutico del tratamiento minimizando la dosis empleada. Por ello, es necesario buscar la “dosis mínima terapéutica” que permita contrarrestar toda la patología, incluyendo las alteraciones auditivas y visuales. Por tanto, se estudió el efecto de esta terapia sobre las alteraciones de las funciones auditiva y visual del modelo murino de la MPSIIIB.

Así bien, el *objetivo general* de la presente tesis doctoral fue **evaluar el efecto terapéutico de una aproximación de terapia génica para contrarrestar las alteraciones de la MPSIIIB**. Este objetivo principal se subdividió en los siguientes *objetivos específicos*:

- 1. Determinar la dosis mínima terapéutica del AAV9-*Naglu* para el tratamiento de la MPSIIIB.** Seleccionar la dosis más baja en relación a la empleada en el estudio previo (Ribera, 2015) que permita conseguir el mismo efecto terapéutico a nivel del SNC y sistémico.
- 2. Evaluar la función auditiva tras el tratamiento con el vector AAV9-*Naglu*.**
- 3. Evaluar la función visual tras el tratamiento con el vector AAV9-*Naglu*.**



## ***IV. Resultados***



***Parte 1. Determinación de la dosis mínima  
terapéutica del vector AAV9-Naglu  
para el tratamiento de la MPSIIIB***





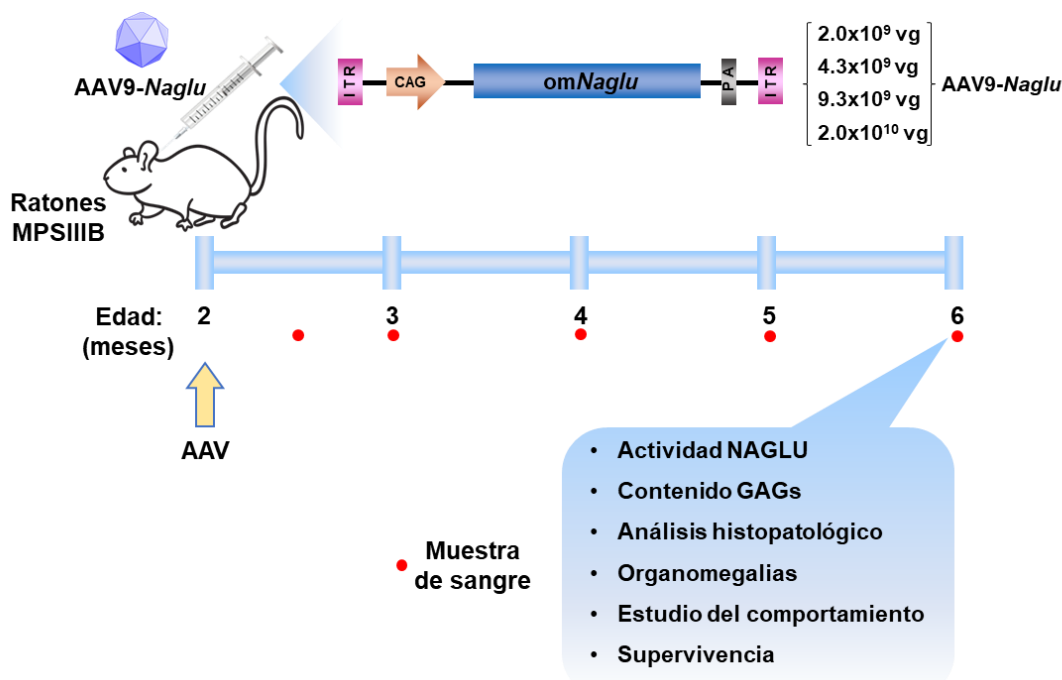
El tratamiento intracisterna magna (IC) de ratones MPSIIIB con el vector AAV9-*Naglu* permitió revertir las principales alteraciones fisiopatológicas de esta enfermedad en el modelo murino (Ribera, 2015). Este vector constaba de la secuencia optimizada del gen murino *Naglu* bajo el control transcripcional del promotor ubicuo CAG, de la secuencia de poliadenilación (PolyA) y de las ITRs que flanqueaban el constructo de expresión. La dosis empleada en dicho estudio ( $3.0 \times 10^{10}$  genomas virales/ratón (vg/ratón)) fue efectiva corrigiendo la enfermedad tanto a nivel del SNC como periférico. Esta aproximación dio lugar a niveles suprafisiológicos de actividad NAGLU a nivel circulante y del SNC. Por ello, y con el objetivo de reducir los niveles de actividad NAGLU, en este estudio se decidió encontrar una dosis menor que la empleada con anterioridad y que lograra el mismo efecto terapéutico para una futura traslación al tratamiento de pacientes MPSIIIB. Con el fin de determinar la “dosis mínima efectiva”, que permitiera una completa corrección de las alteraciones del SNC, periféricas y, sobre todo, a nivel de comportamiento, se analizó el efecto terapéutico de la administración IC del vector AAV9-*Naglu* a 4 dosis diferentes equidistantes entre sí. Se estableció la dosis de  $2.0 \times 10^{10}$  vg como la dosis más alta y la de  $2.0 \times 10^9$  vg como la más baja. A partir de la **Ecuación 1**, se hallaron las otras 2 dosis intermedias restantes, siendo finalmente las 4 dosis a analizar de  $2.0 \times 10^9$ ,  $4.3 \times 10^9$ ,  $9.3 \times 10^9$  y  $2.0 \times 10^{10}$  vg/ratón.

$$y = \sqrt[n-1]{\frac{\text{dosis alta}}{\text{dosis baja}}}$$

**Ecuación 1. Ecuación empleada para el cálculo de las dosis equidistantes del vector viral AAV9-*Naglu*.** y: factor multiplicador que se aplica a cada dosis para calcular la siguiente y obtener dosis equidistantes dentro de un rango definido; n: número total de dosis.

Para evaluar el efecto terapéutico de la administración intra-LCR del vector AAV9-*Naglu*, ratones macho MPSIIIB fueron tratados con las 4 dosis de estudio a los 2 meses de edad por vía IC. Como animales control de la inyección, se emplearon ratones macho MPSIIIB administrados con el vector viral AAV9-*Null* por la misma vía y a la dosis más elevada ( $2.0 \times 10^{10}$  vg). Este vector consta del promotor CAG, de la secuencia de poliadenilación (PolyA) y de las ITRs, pero no contiene el gen terapéutico. Dentro del grupo experimental, también se incluyeron, como controles, ratones macho sanos (WT) y MPSIIIB no tratados. A los 6 meses de edad (4 meses post-administración), todos los grupos experimentales fueron sometidos a la prueba de comportamiento *Open Field* o Actímetro para evaluar los posibles efectos terapéuticos de la administración viral sobre las alteraciones conductuales (**Figura 15**). Tras la eutanasia de los animales, se

obtuvieron diferentes tejidos con la finalidad de determinar el efecto de la terapia a nivel del SNC y periférico. Además, también se evaluó el efecto del tratamiento sobre la esperanza de vida del modelo animal.



**Figura 15. Diseño experimental del estudio de dosis-respuesta al tratamiento con AAV9-Naglu.** El vector viral AAV9-Naglu se administró al LCR por vía intracisterna magna a ratones macho MPSIIIB de 2 meses de edad a las distintas dosis indicadas en la figura. También se administró, por la misma vía, el vector viral AAV9-Null a ratones MPSIIIB a la dosis de  $2.0 \times 10^{10}$  vg. Pasados 4 meses desde la administración, se llevaron a cabo las determinaciones indicadas.

## 1. ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DISTINTAS DOSIS DEL VECTOR VIRAL AAV9-Naglu SOBRE LA PATOLOGÍA NEUROLÓGICA DE LA MPSIIIB

### 1.1. Recuperación de la actividad NAGLU y del contenido de GAGs en el encéfalo

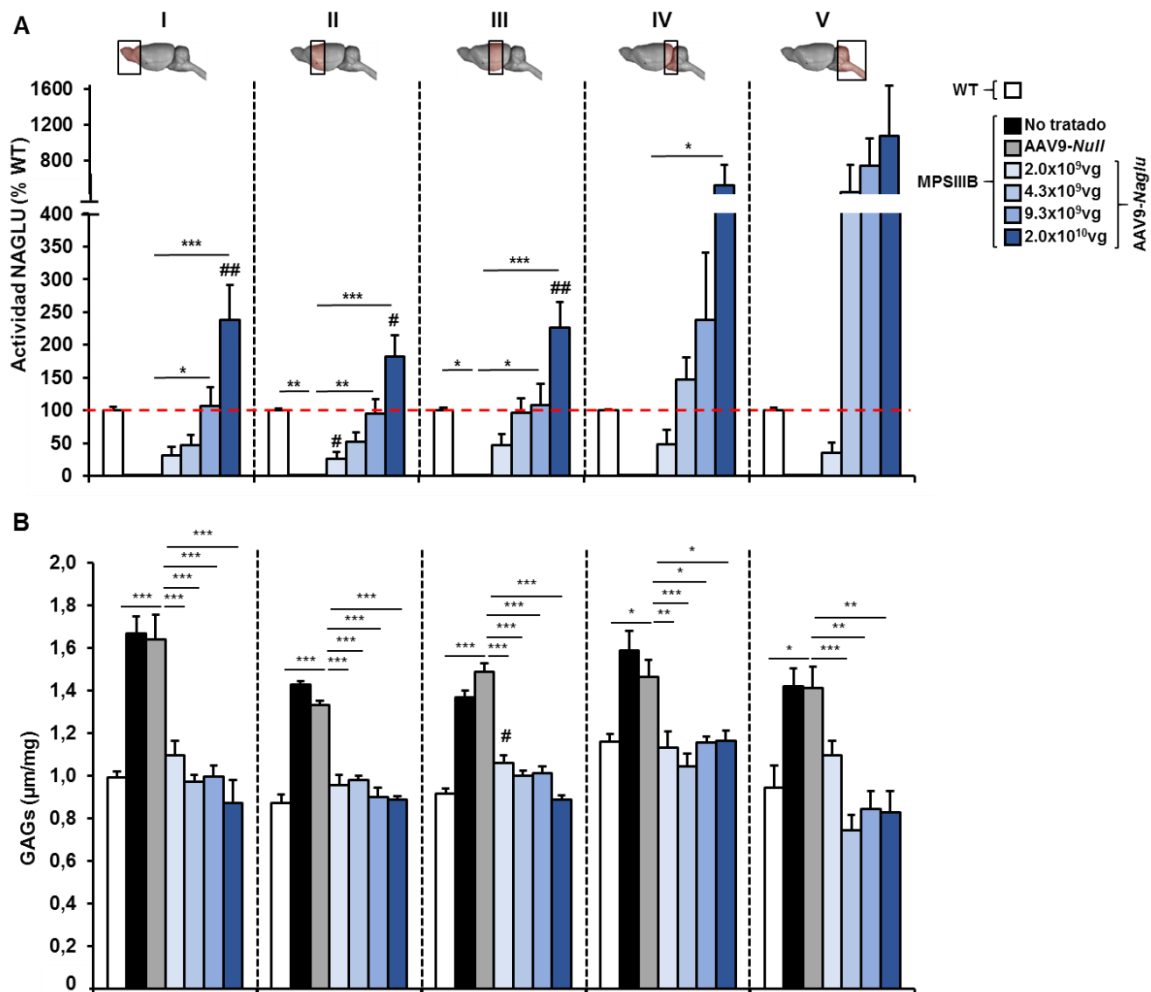
Para analizar la actividad NAGLU y el contenido de GAGs en el encéfalo, éste se dividió en dos partes iguales de manera sagital (derecha e izquierda) y, a su vez, se generaron 5 secciones coronarias, siendo la región “I” la más frontal y la “V” la más caudal.

Tras 4 meses de tratamiento, la determinación de los niveles de actividad NAGLU puso de manifiesto un efecto dosis-dependiente en todas las regiones del encéfalo

analizadas, pues, cuanto mayor era la dosis administrada, más elevados eran los niveles de actividad NAGLU observados (**Figura 16A**). Analizando el efecto de cada dosis por separado, se apreció que los ratones tratados con la dosis más baja llegaban a alcanzar valores de actividad NAGLU en la mayoría de estas regiones equivalentes a los que presentaría un animal heterocigoto (alrededor de un 30% de actividad respecto a un WT). Por otro lado, el grupo tratado con la dosis de  $4.3 \times 10^9$  vg presentaba niveles de actividad NAGLU más elevados, llegando a alcanzar (o incluso a superar) el 100% de actividad respecto a animales sanos en algunas de las regiones analizadas. En el caso de las 2 dosis más altas, los ratones tratados mostraron, no sólo una completa recuperación de los niveles de actividad NAGLU, sino un aumento significativo de éstos respecto a los animales sanos (**Figura 16A**).

El aumento de actividad NAGLU obtenido con todas las dosis administradas se correlacionó con la completa normalización del contenido de GAGs en las regiones equivalentes contralaterales del encéfalo de los ratones tratados (**Figura 16B**). La disminución del acúmulo de GAGs se daba por igual en todas las regiones analizadas, lo que sugería que, incluso niveles bajos de actividad NAGLU (25% de la actividad de ratones sanos) en el encéfalo eran suficientes para corregir la acumulación lisosomal patológica de GAGs.

Por tanto, estos resultados demostraron que la administración IC del vector AAV9-*Naglu* a distintas dosis permitió aumentar los niveles de actividad NAGLU en todas las regiones del encéfalo analizadas. Además, se puso de manifiesto que la presencia de bajos niveles de actividad NAGLU eran suficientes para normalizar el contenido de GAGs en el encéfalo.



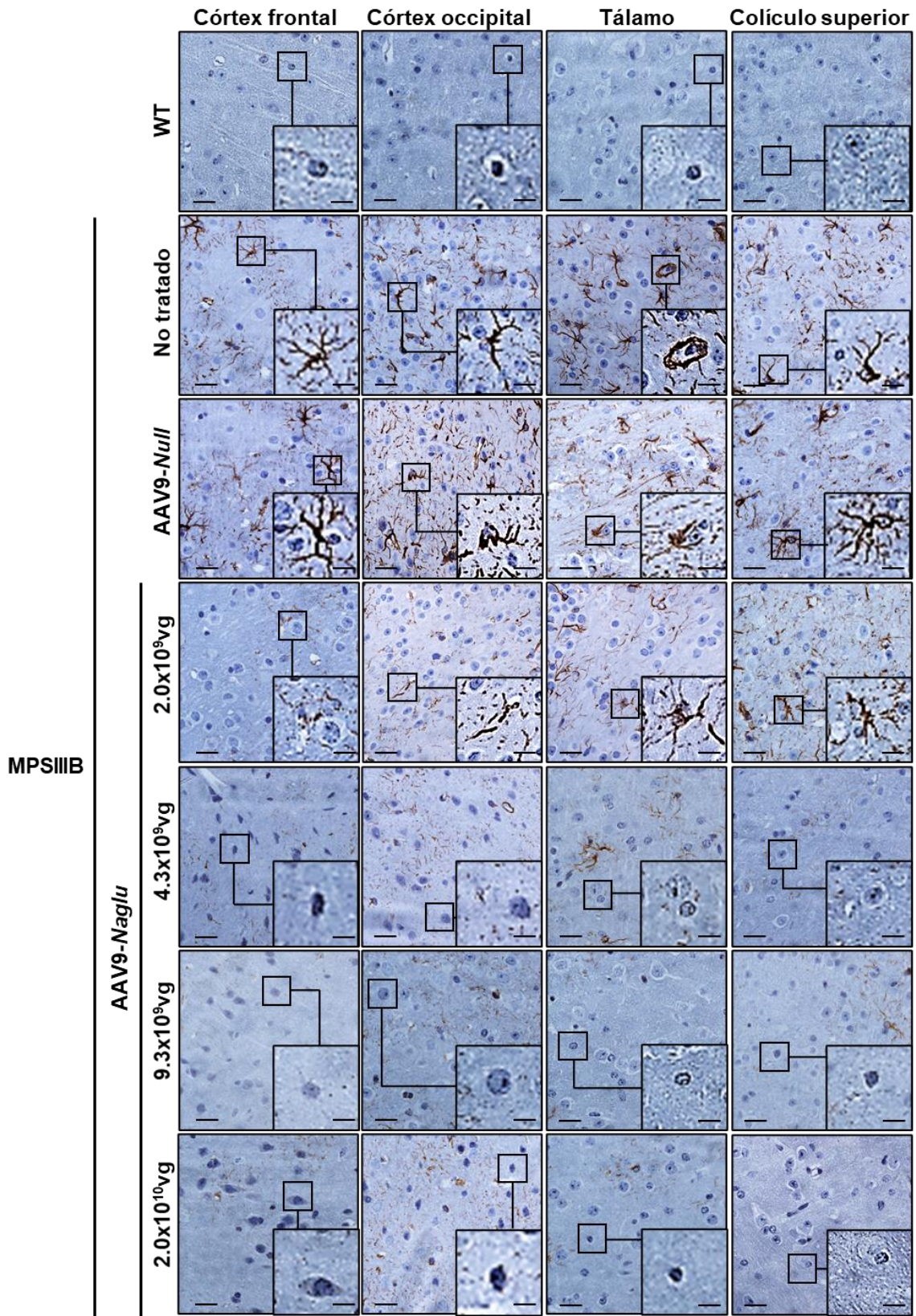
**Figura 16. Determinación de la actividad enzimática NAGLU y cuantificación de GAGs en el SNC.** Se determinaron los niveles de actividad NAGLU y el contenido de GAGs en extractos de encéfalo de ratones WT, MPSIIIB no tratados, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null y con el vector AAV9-Naglu a distintas dosis. **(A)** Aumento dosis-dependiente de la actividad NAGLU en los 4 grupos tratados con el vector AAV9-Naglu a las distintas dosis. **(B)** Normalización del contenido de GAGs en los 4 grupos de tratamiento en todas las regiones del encéfalo analizadas. Las secciones coronarias (I-V) se muestran en la parte superior de las gráficas. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media ± SEM de 4-5 animales por grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. MPSIIIB-Null. #p<0.05, ##p<0.01 vs. WT.

## 1.2. Reversión de la neuroinflamación

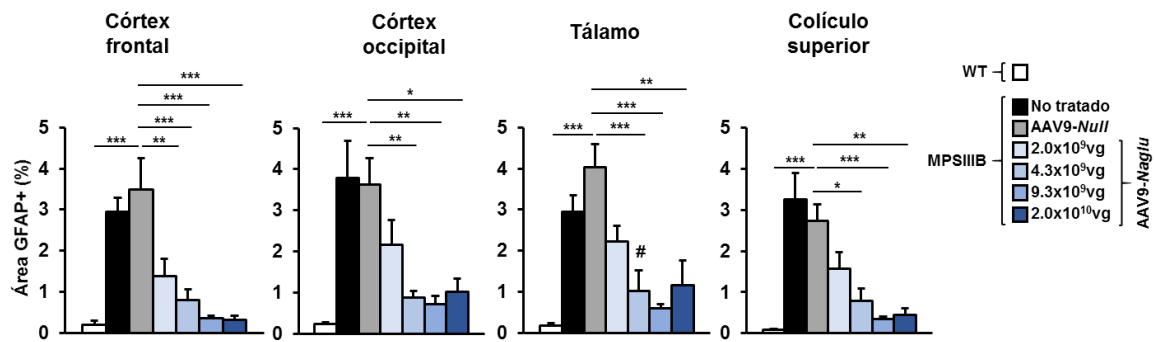
La neuroinflamación, caracterizada por la astrogliosis y microgliosis, es un rasgo fisiopatológico característico de la MPSIIIB (Li, 1999). Para evaluar el efecto del tratamiento con las 4 dosis del vector AAV9-Naglu, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico de marcadores específicos de neuroinflamación en distintas regiones del encéfalo (córtex frontal y occipital, tálamo y colículo superior). Para analizar la astrogliosis se empleó un marcador contra la proteína gliofibrilar acídica (GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y para estudiar la microgliosis se utilizó una lectina que reconoce

la microglía activada (BSI-B4). En todos los casos, se cuantificó la señal positiva tanto para GFAP como para BSI-B4 en todas las regiones analizadas.

Se observó que los ratones MPSIII<sup>B</sup> no tratados y los administrados con el vector AAV9-*Null* presentaban un aumento significativo de la señal para GFAP en comparación con los ratones WT, evidenciando una marcada astrogliosis a los 6 meses de edad. En cambio, todos los grupos tratados con las diferentes dosis del vector AAV9-*Naglu* mostraban una disminución dosis-dependiente de esta proteína (**Figuras 17 y 18**). Los ratones tratados con las 2 dosis más bajas presentaban una disminución parcial de la proteína GFAP, mientras que los animales administrados con las 2 dosis más elevadas mostraban una práctica corrección de la astrogliosis (**Figura 18**).



**Figura 17. Evaluación de la astrogliosis en diferentes regiones del encéfalo.** Imágenes representativas de la señal contra GFAP en diferentes regiones del encéfalo de ratones WT, MPSIIIB no tratados, administrados con el vector AAV9-Null y con las 4 dosis del vector AAV9-Naglu. Se observó una marcada astrogliosis en los 2 grupos de ratones enfermos que disminuía de manera dosis-dependiente en los 4 grupos de animales tratados. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m (10  $\mu$ m, insets).

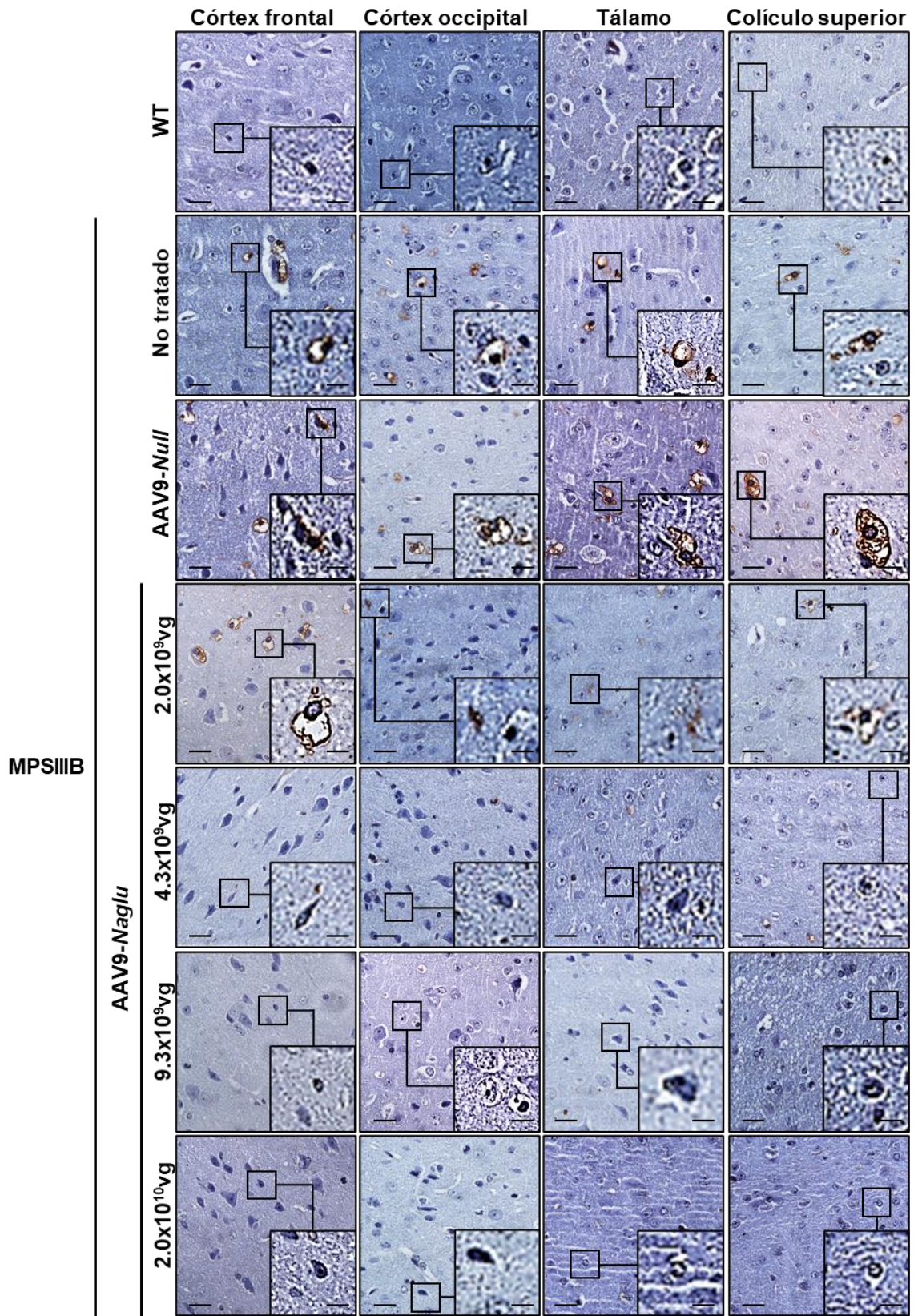


**Figura 18. Cuantificación de los niveles de GFAP en diferentes regiones del encéfalo.** Efecto “dosis-respuesta” en la disminución de los niveles de GFAP que confirmó la mayor reversión de la astrogliosis en los ratones tratados con las dosis más elevadas del vector AAV9-Naglu. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5-6 ratones por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-Null. # $p < 0.05$  vs. WT.

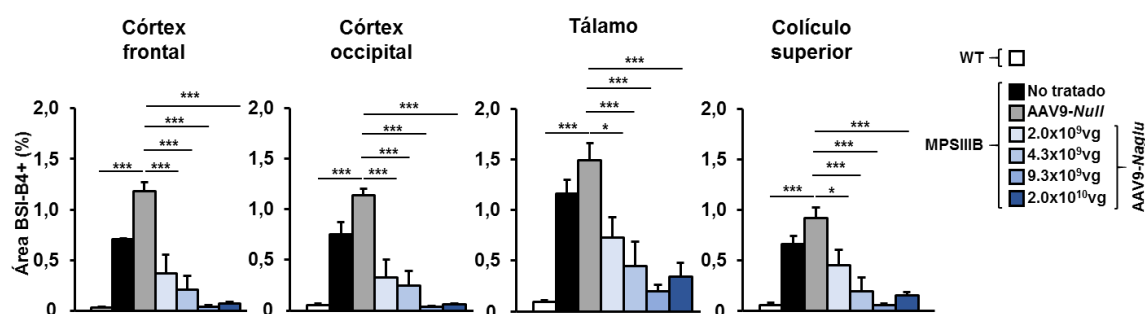
Asimismo, en el caso de la microglia se observó que los niveles de señal de la lectina BSI-B4 eran mayores en los ratones MPSIIIB no tratados y en los administrados con el vector AAV9-Null que en los animales sanos. No obstante, dicha microglia disminuía de manera dosis-dependiente en los grupos tratados con el vector AAV9-Naglu (**Figuras 19 y 20**). Al igual que en la astrogliosis, los ratones tratados con las 2 dosis más altas presentaban una mayor corrección de la microglia que los grupos tratados con las 2 dosis bajas.

En conjunto, estos resultados indicaban una disminución de la neuroinflamación de manera dosis-dependiente en los ratones MPSIIIB tratados con el vector AAV9-Naglu, evidenciando una completa corrección de la astrogliosis y de la microglia en los grupos tratados con las 2 dosis más elevadas.





**Figura 19. Evaluación de la microgliosis en diferentes regiones del encéfalo.** Imágenes representativas de la señal de BSI-B4 en diferentes regiones del encéfalo de ratones WT, MPSIIIIB no tratados, administrados con el vector AAV9-Null y con las 4 dosis del vector AAV9-Naglu. La marcada microgliosis presente en los grupos de ratones enfermos disminuía de manera dosis-dependiente en los 4 grupos de tratamiento. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m (10  $\mu$ m, insets).



**Figura 20. Cuantificación de la señal BSI-B4 en diferentes regiones del encéfalo.** La disminución de la señal BSI-B4 puso de manifiesto un claro efecto “dosis-respuesta” en los ratones tratados con el vector AAV9-Naglu. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5-6 ratones por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-Null.

## 2. ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-Naglu SOBRE LA PATOLOGÍA PERIFÉRICA

### 2.1. Recuperación de la actividad NAGLU y corrección del acúmulo de GAGs en tejidos periféricos

En nuestro laboratorio, se ha demostrado previamente que una parte de los vectores AAV9 administrados al LCR por vía cisterna magna son capaces de pasar al torrente sanguíneo y transducir eficientemente el hígado (Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017). Además, la expresión hepática de proteínas lisosomales de secreción es una fuente de enzima circulante que origina el aumento de actividad NAGLU en el suero y, por consiguiente, permite la corrección de la patología lisosomal en los tejidos periféricos gracias al mecanismo de “corrección-cruzada” (Marcó, 2019).

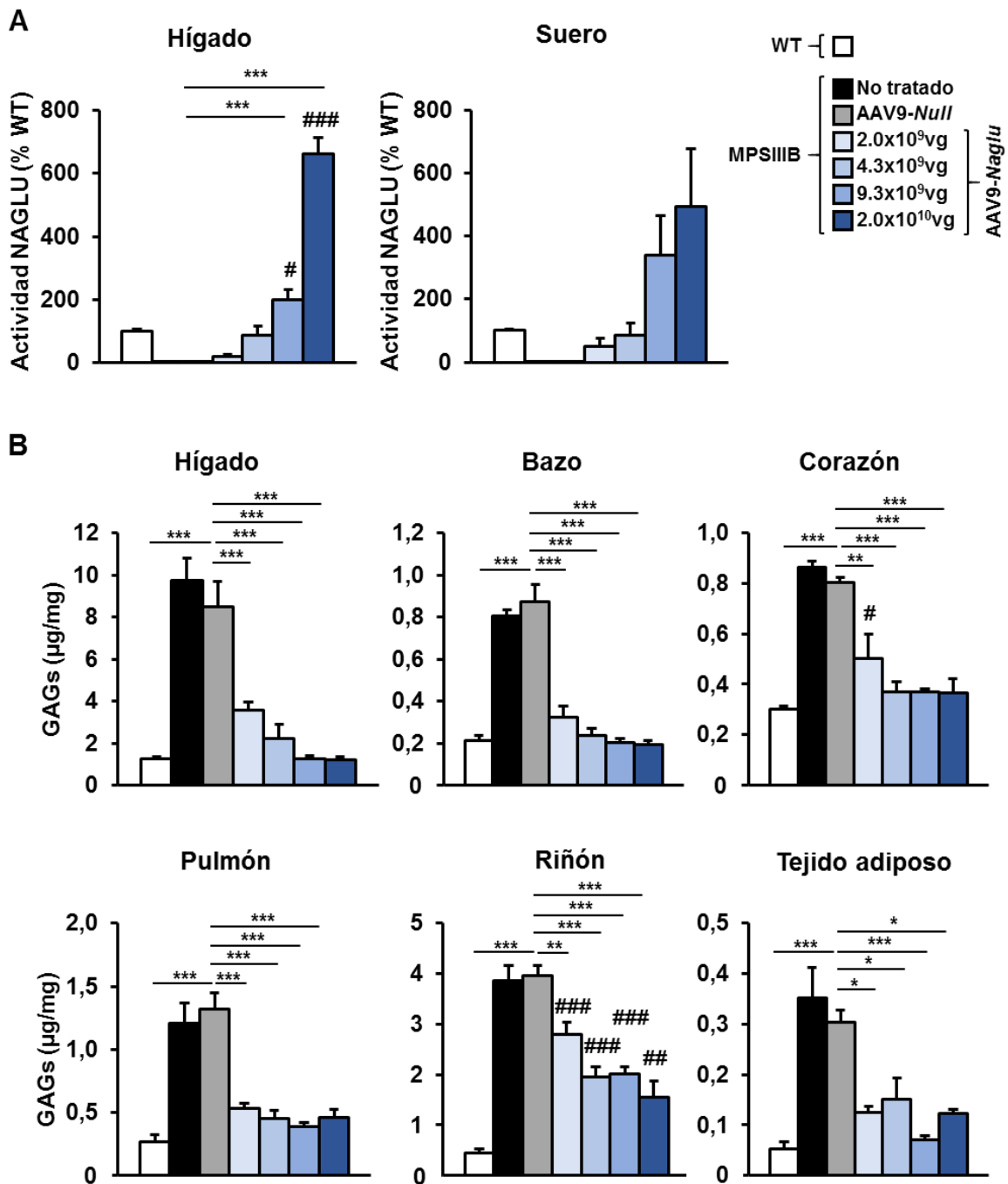
Por tanto, a continuación, se determinaron los niveles de actividad NAGLU tanto en el hígado como a nivel circulante. En los ratones MPSIIIB no tratados y en los administrados con el vector AAV9-Null, los niveles de actividad NAGLU eran prácticamente indetectables, mientras que los 4 grupos tratados con las distintas dosis del vector AAV9-Naglu mostraban un aumento de la actividad NAGLU de manera dosis-dependiente, tanto a nivel hepático como circulante (Figura 21).

Los niveles de actividad NAGLU observados en el hígado de los 4 grupos de tratamiento oscilaban alrededor del 15% y el 700% de actividad de ratones WT (Figura 21A). El incremento de la actividad NAGLU en el hígado resultó en un aumento de

secreción enzimática al suero. Así, a nivel circulante, dichos niveles se encontraban entre un 20% y 500% respecto a un animal sano (**Figura 21A**). Al igual que se observó en el encéfalo, los grupos tratados con las 2 dosis más altas eran los que presentaban mayores aumentos de actividad NAGLU tanto en el hígado como en el suero.

Cuando se analizó el contenido de GAGs en diferentes órganos y tejidos periféricos, se observó que, en el hígado, el bazo, el corazón, los pulmones y el tejido adiposo se producía una corrección completa de este acúmulo anómalo. En cambio, en el riñón, se apreció una marcada disminución de éstos respecto a los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector AAV9-Null (**Figura 21B**). Además, también se observó que en todos los órganos y tejidos analizados se producía una respuesta dosis-dependiente, originándose una mayor corrección del contenido de GAGs con las dosis más altas (**Figura 21B**).

Por tanto, estos resultados indicaban que las 4 dosis del vector AAV9-Naglu provocaban un aumento de la actividad NAGLU circulante que resultó en una disminución del contenido de GAGs en los tejidos periféricos analizados. Aun así, continuaban siendo los grupos tratados con las 2 dosis más elevadas los que mostraban mayores incrementos de la actividad NAGLU tanto a nivel hepático como circulante y, por consiguiente, una mayor corrección del contenido de GAGs en los tejidos analizados.



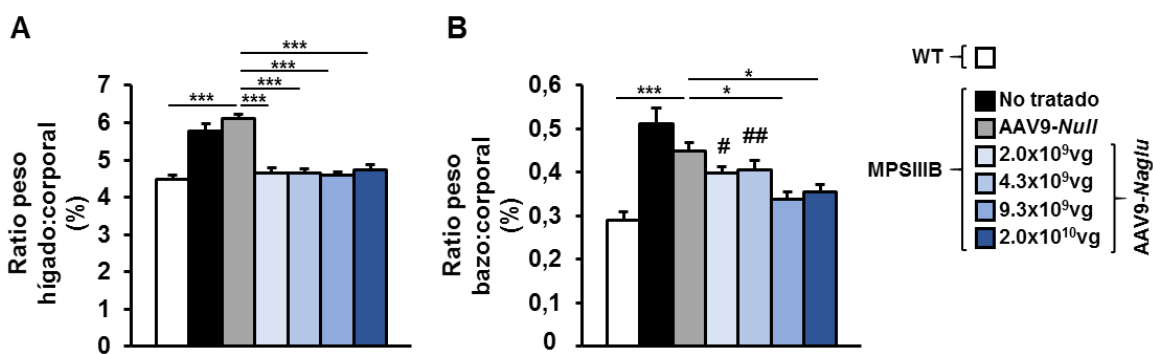
**Figura 21. Aumento de la actividad NAGLU y corrección del contenido de GAGs en tejidos periféricos.** Determinación de los niveles de actividad NAGLU hepáticos y circulantes y del contenido de GAGs en tejidos periféricos. **(A)** Incremento dosis-dependiente de la actividad NAGLU en el hígado y el suero de los grupos tratados con el vector AAV9-Naglu. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5-15 ratones por grupo. **(B)** Normalización del contenido de GAGs en la mayoría de los tejidos periféricos analizados de los 4 grupos de tratamiento. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-5 ratones por grupo. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. MPSIIIB-Null. # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001 vs. WT.

## 2.2. Efecto del tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* sobre las organomegalias

Los pacientes de MPSIIIB presentan hepatomegalia y/o esplenomegalia (*van de Kamp, 1981; Neufeld y Muenzer, 2001*). Por ello, seguidamente, se analizaron estos parámetros tras el tratamiento con las distintas dosis del vector *AAV9-Naglu*.

Al evaluar el peso relativo del hígado y del bazo en referencia al peso corporal de los animales, se observó hepato- y esplenomegalia en los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null* (**Figura 22**). Por el contrario, los grupos de ratones MPSIIIB tratados con el vector *AAV9-Naglu* a las 4 dosis diferentes mostraron una recuperación de estas organomegalias. Mientras que en el hígado, todos los grupos de tratamiento revertían por igual y de manera significativa la hepatomegalia (**Figura 22A**), en el caso del bazo, los animales tratados con las 2 dosis más bajas sólo mostraron una recuperación parcial en el peso relativo de este órgano. Sin embargo, los ratones tratados con las 2 dosis más elevadas sí revertían significativamente la esplenomegalia (**Figura 22B**).

Estos resultados estaban de acuerdo con la gran corrección del acúmulo de GAGs en el hígado y el bazo de los animales tratados con el vector *AAV9-Naglu*.



**Figura 22. Corrección de organomegalias. (A,B)** Determinación del peso relativo del hígado y del bazo de ratones WT, MPSIIIB no tratados, administrados con el vector *AAV9-Null* y tratados con el vector *AAV9-Naglu* a las 4 dosis de estudio. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 14-16 ratones por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-Null. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. WT.

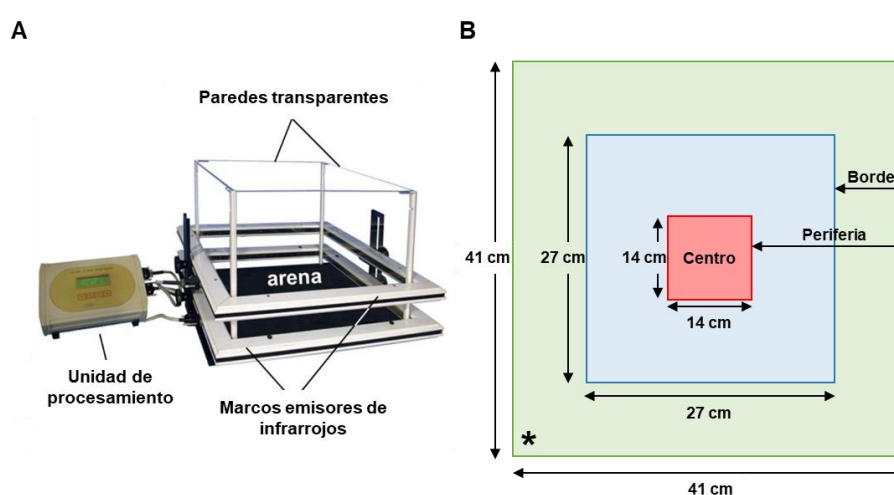
## 2.3. Efecto del tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* sobre las alteraciones del comportamiento

Está ampliamente descrito que el modelo murino de la MPSIIIB presenta importantes déficits en el comportamiento, así como una conducta ansiógena en ambos

sexos a diferentes edades (Li, 1999; Heldermon, 2007; Canal, 2010; Langford-Smith, 2011; Ribera, 2015). Por tanto, para determinar la eficacia terapéutica de cualquier tratamiento es clave estudiar su efecto sobre las alteraciones conductuales.

Con el objetivo de evaluar el efecto de las distintas dosis del tratamiento IC con el vector AAV9-*Naglu* sobre las alteraciones conductuales de este modelo murino, se sometieron los ratones de los distintos grupos experimentales a la prueba del *Open Field* (OF) o Actímetro, que permite evaluar y cuantificar comportamientos ansiógenos cuando los animales se encuentran en un nuevo entorno desconocido. Esta prueba también permite detectar alteraciones de la actividad locomotora (Cressant, 2004; Heldermon, 2007; Fu, 2010; Fu, 2011; Langford-Smith, 2011).

La prueba del OF consiste en exponer al animal a una situación estresante, como dejarlo en un nuevo entorno completamente desconocido, y observar su reacción. Este test consta de un espacio generalmente denominado *arena*, la cual está delimitada por paredes transparentes que le dan la sensación al animal de estar en un espacio abierto (Figura 23A). Esta *arena* se divide en 3 regiones diferentes: Centro, Periferia y Borde, siendo esta última región la que se encuentra estrictamente adyacente a las paredes (Figura 23B). Mientras que la parte más central corresponde a la parte más ansiógena del Actímetro (motivo por el cual los ratones evitan entrar durante los primeros minutos del examen), el borde se corresponde con la menos ansiógena, ya que el contacto del cuerpo del animal con las paredes les transmite una mayor sensación de protección y seguridad frente a espacios abiertos.



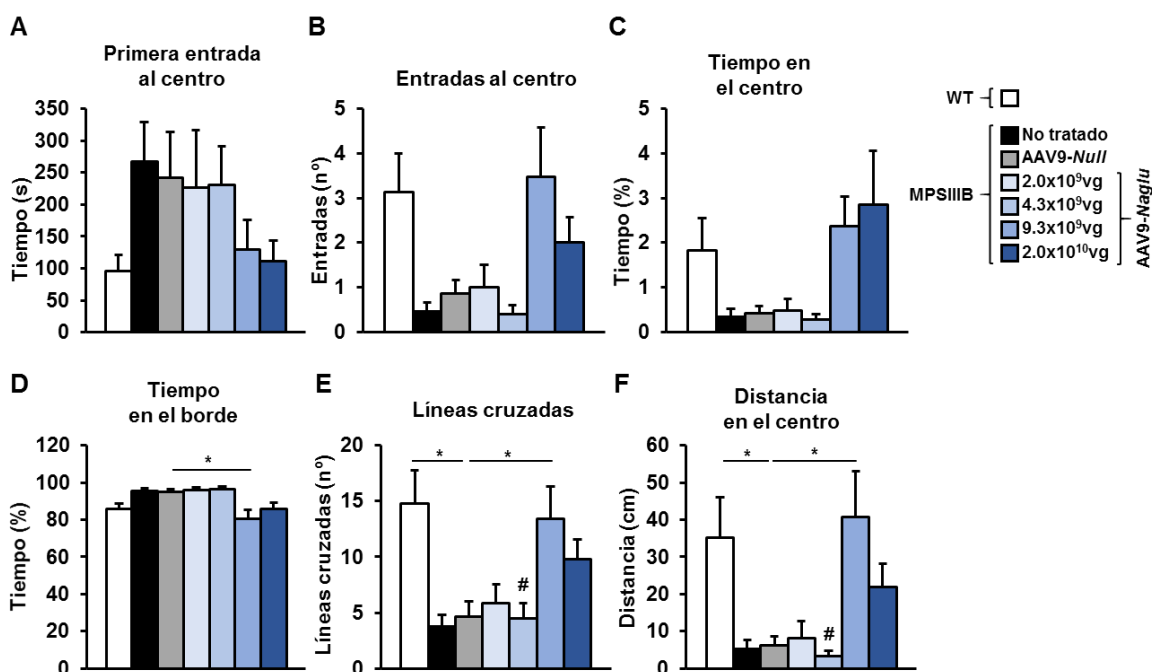
**Figura 23. Actímetro y representación gráfica de la arena. (A)** El Actímetro está compuesto por la arena (espacio delimitado por las paredes transparentes), dos marcos emisores de rayos infrarrojos para detectar el movimiento vertical y horizontal de los ratones y por una unidad de procesamiento de datos. **(B)**

Representación esquematizada de las regiones en las que se divide la arena. El asterisco indica el punto inicial donde se deposita el ratón al comienzo del examen.

Tras 4 meses de tratamiento, se analizaron diversos parámetros de ansiedad y actividad locomotora con el OF. Las principales diferencias significativas se observaron durante los 2 primeros minutos del examen, ya que, pasado este tiempo, estas diferencias se diluían. Se observó que los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null* tardaban más tiempo en entrar por primera vez al centro que los animales WT. Sin embargo, los ratones tratados con las 2 dosis más altas del vector terapéutico presentaban una disminución en el tiempo que tardaban en entrar al centro por primera vez (**Figura 24A**). Esto estaba de acuerdo con el número de veces que los animales entraban al centro, pues cuanto menos tiempo tardaban en entrar al centro, más entradas se computaban durante el tiempo que duraba el examen (**Figura 24B**). En este caso, también se observó que los grupos tratados con las 2 dosis más elevadas presentaban un número de entradas al centro similar a los ratones WT (**Figura 24B**). Además, también se apreció que, tanto los 2 grupos de ratones enfermos, como los tratados con el vector *AAV9-Naglu* a las 2 dosis más bajas permanecían menos tiempo en la zona central, mientras que los animales tratados con las 2 dosis más altas del vector *AAV9-Naglu* permanecían más tiempo en el centro (**Figura 24C**). En cuanto al tiempo que los ratones estaban en el borde, se apreció que los ratones tratados con las 2 dosis más elevadas mostraron una disminución frente a los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null*. En cambio, sólo se observó una diferencia significativa entre los ratones tratados con la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg respecto a los MPSIIIB-*Null*. (**Figura 24D**). Estos resultados demostraron una disminución de los niveles de ansiedad en los ratones tratados con el vector *AAV9-Naglu* con las 2 dosis más altas (**Figura 24A-D**).

Por otro lado, también se observaron efectos terapéuticos del tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* en la actividad locomotora. Así, el número de líneas cruzadas por los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null* era menor que el de los animales sanos, mientras que los 4 grupos de tratamiento aumentaban el número de líneas cruzadas, evidenciando una mayor actividad locomotora (**Figura 24E**). Además, también se observó que la distancia recorrida en el centro por los 2 grupos de ratones enfermos y los tratados con las 2 dosis más bajas era menor en comparación con la que recorrían los ratones WT. No obstante, los animales tratados con las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg presentaban una mayor distancia recorrida en el centro (**Figura 24F**).

Así pues, los resultados obtenidos en el estudio de estos parámetros demostraron que los ratones tratados con las 2 dosis más elevadas recuperaban la actividad locomotora y disminuían la ansiedad en mayor medida que los animales tratados con las 2 dosis más bajas (**Figura 24A-F**). Sin embargo, es importante destacar que la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg es la dosis más baja a la que se observó un efecto terapéutico completo sobre las alteraciones del comportamiento.

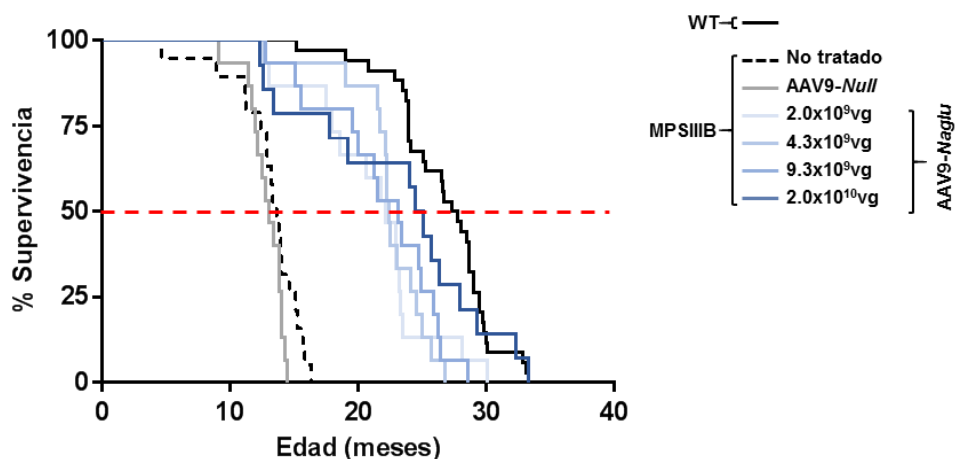


**Figura 24. Efecto del tratamiento con distintas dosis del vector AAV9-Naglu sobre las alteraciones del comportamiento.** Determinación de parámetros de ansiedad (A-D) y de actividad locomotora (E,F) en el test de *Open Field* en ratones WT, MPSIIIIB no tratados, administrados con el vector AAV9-Null y tratados con las distintas dosis del vector AAV9-Naglu. Los datos mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 9-15 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs. MPSIIIIB-Null. # $p < 0.05$  vs. WT.

#### 2.4. Efecto del tratamiento con el vector AAV9-Naglu sobre la supervivencia

El efecto de cualquier tratamiento de terapia génica sobre la supervivencia es otro parámetro clave para valorar la eficacia de éste a largo plazo. Por ello, se estudió el efecto de las distintas dosis del vector AAV9-Naglu en la esperanza de vida de los ratones tratados. A diferencia de los animales MPSIIIIB no tratados o administrados con el vector AAV9-Null (cuya vida media era de  $\sim 13$  meses), todos los grupos de tratamiento presentaron una supervivencia mayor (**Figura 25, Tabla 3**). Al igual que en otros parámetros analizados, aquí también se observó una respuesta dosis-dependiente en el aumento de la esperanza de vida de los ratones tratados.





**Figura 25. Efecto del tratamiento con distintas dosis del vector AAV9-Naglu sobre la supervivencia.** Representación de Kaplan-Meier mostrando las curvas de supervivencia de ratones de los distintos grupos experimentales. Los datos mostrados corresponden a la supervivencia de ratones WT (n=34), MPSIIIB no tratados (n=19), MPSIIIB-Null (n=15) y MPSIIIB tratados a las dosis de  $2.0 \times 10^9$  vg (n=15),  $4.3 \times 10^9$  vg (n=15),  $9.3 \times 10^9$  vg (n=15) y  $2.0 \times 10^{10}$  vg (n=14).

**Tabla 3. Supervivencia media de ratones WT, MPSIIIB no tratados, administrados con el vector AAV9-Null y tratados con las 4 dosis del vector AAV9-Naglu**

Genotipo	Tratamiento	Dosis (vg/ratón)	Supervivencia media (meses)
WT	No tratado	-	26,7
MPSIIIB	No tratado	-	13,1
	AAV9-Naglu	$2.0 \times 10^{10}$	12,8
		$2.0 \times 10^9$	21,2
		$4.3 \times 10^9$	22,4
		$9.3 \times 10^9$	21,9
		$2.0 \times 10^{10}$	23,12

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que, transcurridos 4 meses desde la administración IC de las 4 dosis del vector AAV9-Naglu, se observaba una mejoría dosis-dependiente en la mayoría de los parámetros analizados. El tratamiento con las 2 dosis más altas mostró una mayor reversión de las afectaciones del SNC y periféricas, así como una corrección de la alteración conductual y un aumento significativo en la esperanza de vida de los ratones tratados. Este estudio también demostró que la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg es la que se podría designar como “dosis mínima terapéutica”, pues era la dosis más baja a la que se observaba corrección de los niveles de actividad NAGLU y del contenido de GAGs, tanto a nivel del SNC como periférico. Además, esta dosis también permitía contrarrestar las alteraciones del comportamiento y prolongar la supervivencia de manera muy significativa.

Así pues, esta primera parte de la tesis se ha centrado, principalmente, en la evaluación del tratamiento con distintas dosis del vector AAV9-*Naglu* sobre las afectaciones más graves de la enfermedad a fin de determinar la “dosis mínima efectiva” en el modelo animal. En el estudio previo realizado en nuestro laboratorio (*Ribera, 2015*), los ratones MPSIIIB se trataron con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $3.0 \times 10^{10}$  vg, es decir, una dosis 3 veces superior a la designada como “mínima terapéutica”.

Dado que, tanto los pacientes como el modelo murino de esta enfermedad presentan otras alteraciones muy invalidantes que afectan a la función auditiva y a la función visual (*Del Monte, 1983; Heldermon, 2007; Mesolella, 2013; Tse, 2015*), tras la designación de la “dosis mínima terapéutica” en este estudio, las siguientes partes de este trabajo se centraron en la evaluación del efecto del tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg sobre las alteraciones de la función auditiva y de la función visual de este modelo murino.



***Parte 2. Evaluación de la función auditiva  
tras el tratamiento de ratones  
MPSIIIB con el vector AAV9-Naglu***



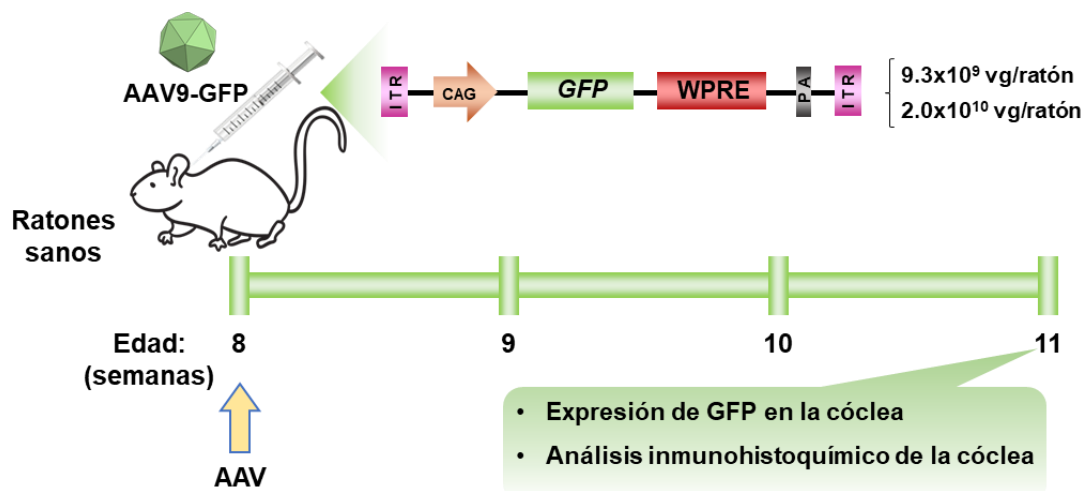
## 1. BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR VIRAL AAV9 EN LA CÓCLEA TRAS LA ADMINISTRACIÓN AL LCR POR VÍA CISTERNA MAGNA

El estudio llevado a cabo previamente (*Ribera, 2015*) y los resultados de la primera parte de este trabajo pusieron de manifiesto la corrección completa de las principales alteraciones de la MPSIIIB en el modelo murino tras la administración intra-LCR del vector AAV9-*Naglu*. En la segunda parte de esta tesis doctoral, se pretendió estudiar el posible efecto terapéutico de la misma terapia sobre la pérdida progresiva de la función auditiva del modelo murino de la MPSIIIB.

Antes de iniciar un estudio de eficacia del vector AAV9-*Naglu* sobre la función auditiva, era esencial determinar la capacidad del vector AAV9, tras su administración al LCR, de llegar al oído interno y transducir la cóclea, el órgano afectado responsable de la pérdida de la función auditiva.

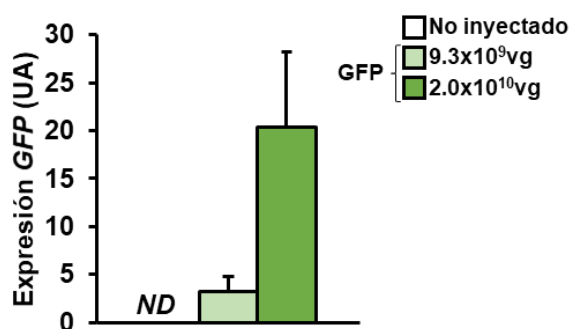
El estudio de dosis-respuesta llevado a cabo en la primera parte de este trabajo demostró que las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg eran las que presentaban una mayor corrección de la patología MPSIIIB en los ratones tratados. Por tanto, se estudió en primer lugar el perfil de biodistribución del vector AAV9 en la cóclea tras su administración IC a ambas dosis. Para ello, se empleó el vector AAV9-GFP, que consta de las ITRs, el promotor CAG, la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP: *Green Fluorescent Protein*), la secuencia WPRE (*Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*), para potenciar la expresión de genes codificados en los vectores virales (*Klein, 2006*) y la secuencia PolyA. El estudio inmunohistoquímico basado en la detección de esta proteína permitiría visualizar las estructuras de la cóclea transducidas por el vector.

Transcurridas 3 semanas desde la administración intra-LCR de ambas dosis del vector AAV9-GFP a ratones sanos de 8 semanas de edad, los animales se eutanasiaron y se obtuvieron las cócleas y se analizaron los niveles de expresión del gen *GFP* y, mediante análisis inmunohistoquímicos, su localización dentro de la estructura de la cóclea (**Figura 26**).



**Figura 26. Diseño experimental del estudio de biodistribución del vector AAV9-GFP.** Ratones sanos de 8 semanas de edad fueron administrados con el vector AAV9-GFP a las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg. Tras 3 semanas de la administración intra-OCR, los animales fueron eutanasiados y se analizaron los parámetros indicados.

Al medir los niveles de expresión *GFP* en la cóclea, se detectaron niveles cuantificables de expresión génica en los ratones administrados con ambas dosis (**Figura 31**). Se observó una respuesta dosis-dependiente, dándose una expresión del gen *GFP* de unas 5 veces más elevada en los ratones administrados con la dosis de  $2.0 \times 10^{10}$  vg frente a los administrados con la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg (**Figura 27**). Por tanto, ello indicaba que el vector AAV9, tras su administración IC, era capaz de llegar al oído interno y transducir eficientemente la cóclea y de manera dosis-dependiente.

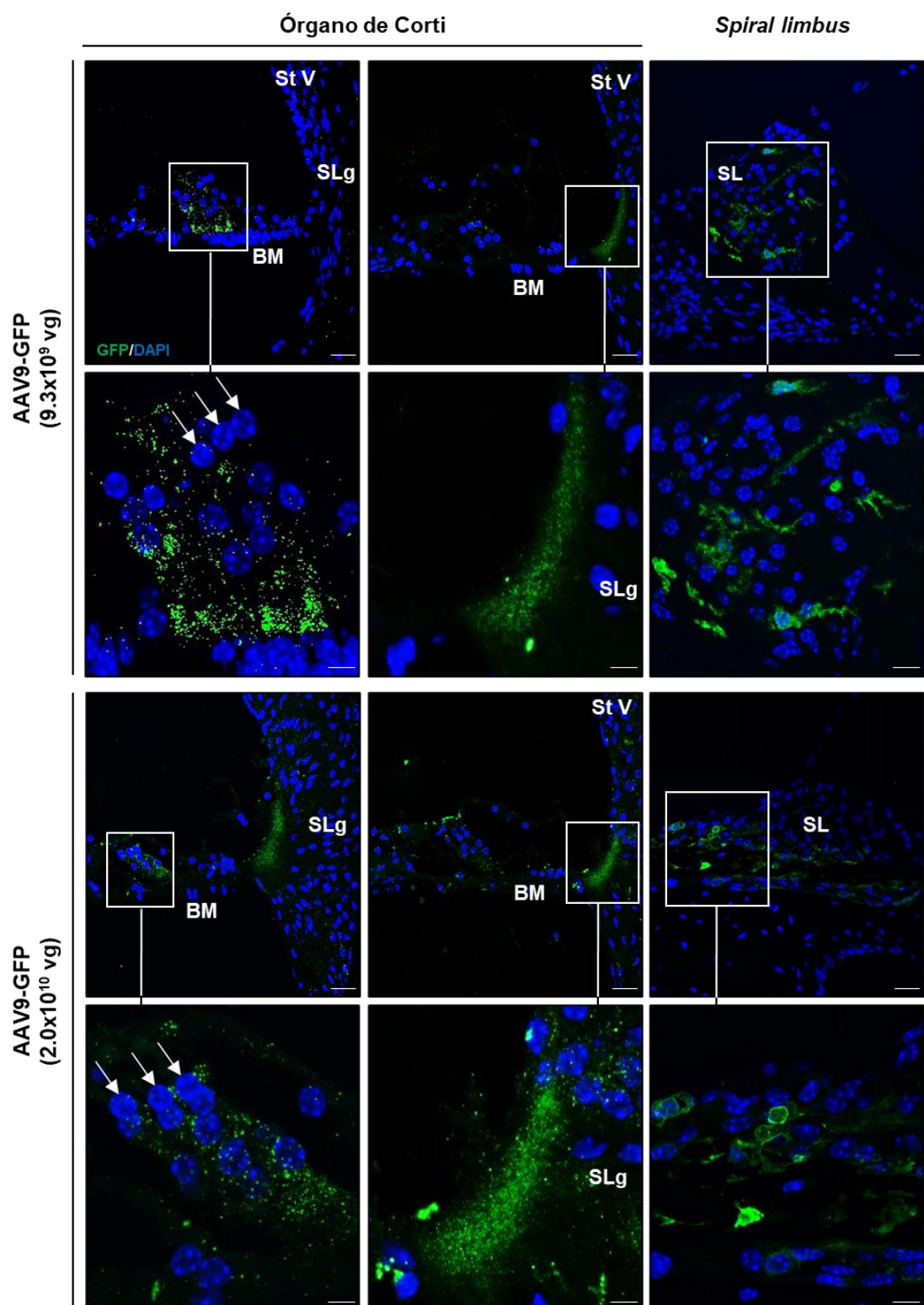


**Figura 27. Determinación de los niveles de expresión GFP en la cóclea.** Se evaluaron los niveles de expresión *GFP*, expresado en unidades arbitrarias (UA), de los ratones administrados con las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg del vector AAV9-GFP. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-7 animales por grupo.

Mediante análisis inmunohistoquímicos de las cócleas, se observaron las distintas regiones transducidas por el vector AAV9-GFP (**Figura 32**). Es importante destacar que, tras la administración con ambas dosis del vector AAV9-GFP, se observaba señal positiva para GFP en el epitelio sensorial del órgano de Corti, pues la transducción de las OHCs (*Outer Hair Cells*) es esencial para la preservación de la función auditiva. Otras estructuras que presentaron una transducción significativa fueron el *Spiral Ligament* (SLg) y el SL (**Figura 28**). Ambas estructuras están constituidas por periostio, lo que indicaría que el vector AAV9 era capaz de transducir el tejido conjuntivo adherido a la parte externa del hueso de la cóclea.

Estos resultados mostraron la capacidad del vector AAV9-GFP de transducir eficientemente la cóclea a ambas dosis tras su administración IC. Teniendo en cuenta estos resultados junto con los obtenidos en la primera parte de este trabajo, donde la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg era la más baja a la que se observaba corrección de las alteraciones conductuales, se decidió evaluar el efecto terapéutico de la administración del vector AAV9-*Naglu* a dicha dosis sobre las alteraciones auditivas.

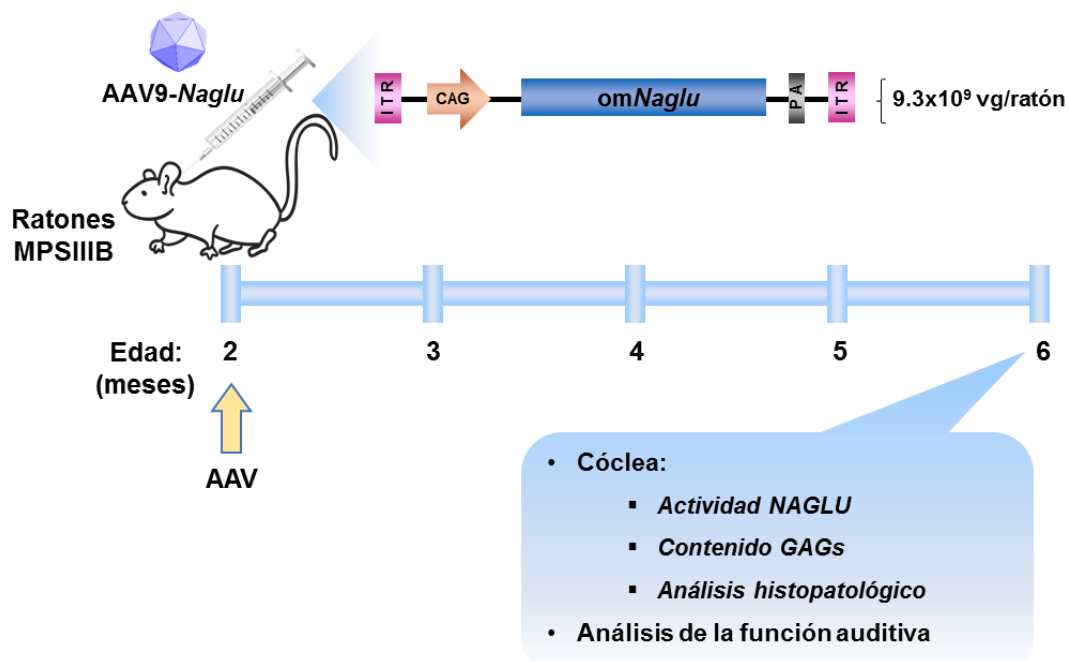




**Figura 28. Análisis inmunohistoquímico contra GFP para determinar la biodistribución del vector AAV9-GFP en la cóclea.** Se evaluó la capacidad del vector AAV9-GFP de transducir la cóclea. Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico de fluorescencia de cortes transversales de cóclea de ratones administrados con las dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg del vector AAV9-GFP ( $n=7$  animales/grupo). Las flechas indican las OHCs. St V: Stria vascularis, BM: Basilar membrane (membrana basilar), SLg: Spiral Ligament (ligamento espiral), TM: Tectorial membrane (membrana tectorial) y SL: Spiral Limbus. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m (10  $\mu$ m, insets).

## 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR AAV9-*Naglu* SOBRE LA FUNCIÓN AUDITIVA

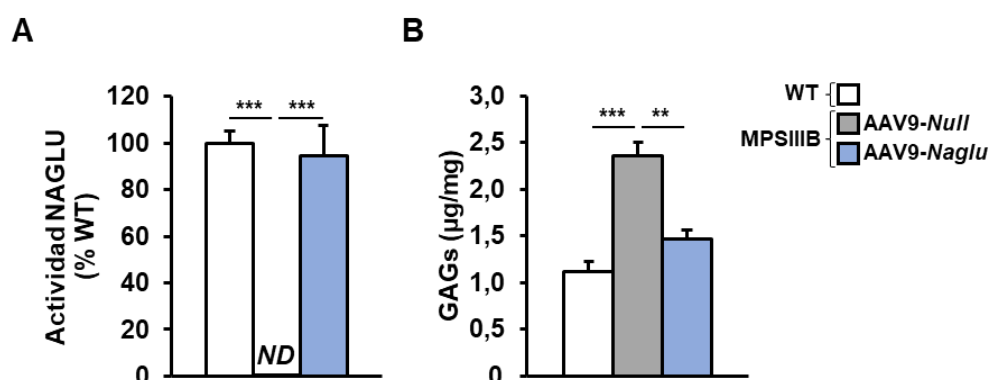
Para evaluar el efecto del tratamiento sobre esta alteración, se emplearon ratones MPSIIIB macho de 2 meses de edad a los que se les administró al LCR el vector AAV9-*Naglu* a la dosis designada como “mínima terapéutica” ( $9.3 \times 10^9$  vg) por vía cisterna magna. Es importante destacar que, a esta edad, los ratones MPSIIIB no presentan alteraciones auditivas, aunque la enfermedad está completamente establecida a nivel del SNC (*Heldermon, 2007; Ribera, 2015*). También, se incluyeron en el grupo experimental animales macho WT y MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* a la misma dosis como grupo control de la inyección. Transcurridos 4 meses desde la administración, los ratones fueron sometidos a una prueba para estudiar la función auditiva (*ABR: Auditory Brainstem Response*) que permitía evaluar y cuantificar los niveles de audición de los ratones. La edad de análisis de la función auditiva se estableció a los 6 meses, ya que, a partir de esta edad, los ratones sanos de la cepa C57Bl/6 empiezan a presentar signos claros de presbiacusia o pérdida de la capacidad auditiva (*Kane, 2012*). Posteriormente, los ratones se eutanasiaron y se obtuvieron las cócleas para analizar en ellas parámetros histopatológicos, determinar niveles de actividad NAGLU y cuantificar el contenido de GAGs. En la **Figura 29** se presenta un esquema con el diseño experimental del estudio.



**Figura 29. Diseño experimental para la evaluación del tratamiento en la función auditiva.** A ratones MPSIIIB de 2 meses de edad se les administró por vía IC directamente al LCR el vector viral AAV9-Naglu a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. Transcurridos 4 meses desde la inyección, se evaluaron los efectos del tratamiento. Se analizaron parámetros funcionales auditivos y en la cóclea se determinaron los niveles de actividad NAGLU y el contenido de GAGs. También se realizó un estudio histopatológico de ésta.

## 2.1. Corrección de la actividad NAGLU y normalización del contenido de GAGs en la cóclea

Tras 4 meses de tratamiento con el vector AA9-Nalgu, se observó que, en la cóclea de los ratones MPSIIIB tratados, se recuperaban los niveles de actividad NAGLU hasta conseguir valores equiparables a los de animales sanos (**Figura 30A**). Además, gracias al restablecimiento de esta actividad enzimática, el contenido de GAGs en la cóclea de estos ratones se normalizaba (**Figura 30B**).



**Figura 30. Corrección de la actividad NAGLU y normalización del contenido de GAGs en la cóclea.** Se determinaron los niveles de actividad NAGLU y se cuantificó el contenido de GAGs tras 4 meses desde la administración intra-LCR del vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. **(A)** Recuperación de los niveles de actividad NAGLU en la cóclea del grupo de tratamiento. **(B)** Normalización del contenido de GAGs en la cóclea de los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu*. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales por grupo para la actividad NAGLU y 3-6 animales por grupo en la determinación de GAGs. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-Null. ND: no detectable.

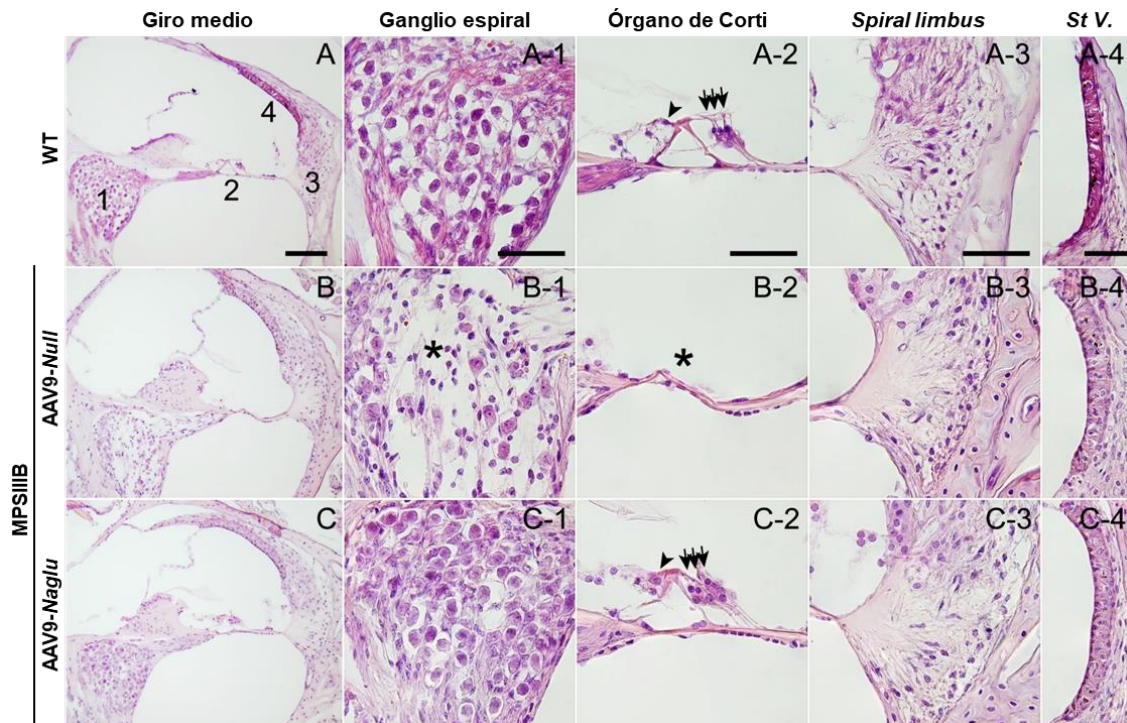
Por lo tanto, estos resultados evidenciaron que la administración IC del vector AAV9-*Naglu* corregía la actividad NAGLU y normalizaba el contenido de GAGs en la cóclea de ratones MPSIIIB tratados. Además, indicaban que la cóclea se transducía eficientemente con el vector terapéutico y que se producía enzima. Sin embargo, también se debe tener en cuenta la posibilidad de que parte de la actividad NAGLU de la cóclea se deba a la enzima circulante en el LCR, y que ésta llegue hasta la cóclea a través del acueducto coclear (Figura 16). Así pues, la presencia de actividad NAGLU sugería que este tratamiento podría mejorar la función auditiva de los ratones tratados.

## 2.2. Conservación de la citoarquitectura de la cóclea

A continuación, se analizó cómo afectaba el tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* a la citoarquitectura coclear. El análisis morfológico de cortes transversales de la cóclea mostró cómo, a los 6 meses de edad, los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null presentaban dañada la estructura del giro medio del ducto coclear (Figura 31). De entre las principales estructuras de la cóclea, se observó una pérdida de la morfología normal del ganglio espiral (Figura 31B-1) y del epitelio sensorial del órgano de Corti (Figura 31B-2). La morfología del *Spiral Limbus* (SL) también se vio afectada en estos animales (Figura 31B-3), mientras que la *Stria Vascularis* (St V) no presentaba modificaciones (Figura 31B-4). Sin embargo, tras 4 meses de tratamiento, los ratones que se administraron con el vector AAV9-*Naglu* presentaban la conservación de las

estructuras del ganglio espiral y del órgano de Corti indistinguibles en comparación con los ratones WT (**Figura 31C-1,C-2**). En cuanto al SL de los ratones tratados, no se observó diferencias respecto a los ratones MSP11B-Null (**Figura 31C-3**). Al igual que en los ratones MSP11B-Null, la St V de los ratones tratados tampoco presentaba diferencias respecto a los ratones WT (**Figura 31C-4**). Paralelamente, también se estudió la citoarquitectura del giro basal del ducto coclear. En él, se observó la afectación de las mismas estructuras que en el giro medio, pero los resultados pusieron de manifiesto que no había diferencias entre los ratones MSP11B administrados con el vector AAV9-Null y los animales tratados con el vector terapéutico (*datos no mostrados*).

A pesar de que la corrección de la morfología no se apreció en la totalidad de la cóclea (no se corregía en el giro basal), sí que se demostró que, tras 4 meses de tratamiento, los ratones tratados con el vector AAV9-Naglu preservaban la citoarquitectura en regiones concretas de la cóclea. La conservación del epitelio sensorial del órgano de Corti es crucial para la preservación de la función auditiva, pues las HCs (*Hair Cells*) son las responsables de la percepción del sonido para transformar el estímulo acústico percibido en corrientes eléctricas nerviosas que llegarán al córtex auditivo (*Hunter, 2020*).



**Figura 31. Conservación de la citoarquitectura coclear.** Secciones transversales de la cóclea que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. La primera columna muestra el giro medio del ducto coclear, las siguientes columnas muestran detalles de las principales estructuras de la cóclea: el ganglio espiral (1), el órgano de Corti (2), el *Spiral Limbus* (SL) (3) y la *Stria Vascularis* (St V) (4). Las cabezas de flecha en A-2 y C-2 señalan IHCs (*Inner Hair Cells*), las flechas señalan OHCs (*Outer Hair Cells*). Barra de escala para las fotos: 100  $\mu$ m (primera columna) y 50  $\mu$ m (columnas 2, 3, 4 y 5).

### 2.3. Evaluación del tratamiento en la función auditiva

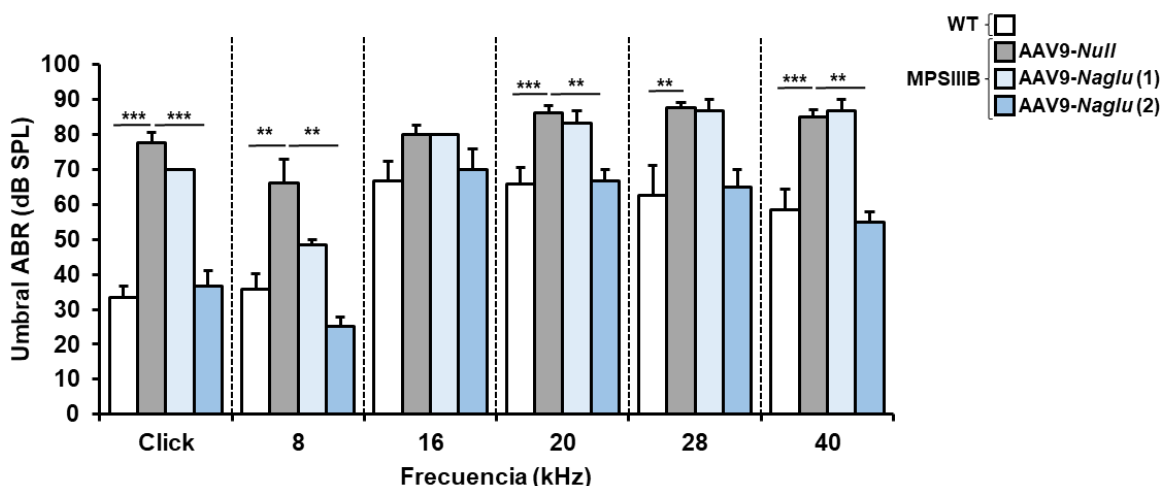
Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento con el AAV9-*Naglu* sobre la función auditiva, se sometieron los ratones a la prueba ABR (*Auditory Brainstem Response*). Se trata de una técnica neurofisiológica que permite evaluar la funcionalidad de las estructuras nerviosas periféricas y centrales que conforman la vía auditiva. Se basa en la estimulación auditiva con sonidos de características conocidas (frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación, etc) y posterior registro de la actividad eléctrica generada por las neuronas de la vía auditiva mediante electrodos colocados en posiciones estándar (de manera subdérmica, los electrodos se colocan bajo las orejas del ratón y en la parte frontal de la cabeza).

El ABR posibilita la determinación del umbral auditivo y de la velocidad de conducción del estímulo sonoro entre los distintos núcleos del tronco cerebral. La estimulación auditiva puede realizarse mediante dos tipos de sonidos: el “click”, un estímulo auditivo inespecífico compuesto por el espectro de frecuencias audibles y que activa a todas las neuronas del receptor auditivo; o el “tono”, un estímulo auditivo formado por una frecuencia específica (y armónica) y que estimula una región concreta del órgano de Corti.

El análisis tras la realización del test ABR puso de manifiesto que los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* presentaban un umbral auditivo en respuesta al click significativamente superior al de los ratones WT (**Figura 32**). Los ratones MPSIIIB-*Null* mostraron un umbral promedio en el rango de la hipoacusia profunda (>70 dB SPL) en comparación con los animales WT (**Figura 32**). Sin embargo, un subgrupo de los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu* mostraban una hipoacusia moderada (3/6), mientras que el otro subgrupo preservaba los niveles de audición similares a los de ratones WT (3/6) (**Figura 32**).

Asimismo, se analizaron los umbrales auditivos en respuesta a tonos puros de frecuencias comprendidas entre 8 y 40 kHz. Se observó que los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* presentaban diferencias significativas respecto a los animales sanos para la mayoría de las frecuencias analizadas (**Figura 32**). Los animales MPSIIIB-*Null* presentaban un umbral en el rango de la hipoacusia grave-profunda en todas las frecuencias a partir de 16 kHz (**Figura 32**), mientras que los ratones WT presentaban una situación de normoaudición con ligera elevación de los umbrales para frecuencias altas, típico perfil de la presbiacusia (**Figura 32**). En general, para todas las frecuencias analizadas, se observó que un subgrupo de ratones tratados

con el vector AAV9-*Naglu* no preservaba la capacidad auditiva, manteniendo niveles de hipoacusia similares a los de ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null*. Por el contrario, el otro subgrupo de los ratones tratados disminuía los umbrales de audición hasta niveles indistinguibles a los de ratones WT, alcanzando la normoacusia (**Figura 32**). Por tanto, el 50% de los animales tratados con el vector AAV9-*Naglu* presentaban preservación de la función auditiva.



**Figura 32. Efecto del tratamiento IC con AAV9-*Naglu* sobre la función auditiva.** Determinación del umbral auditivo en ratones WT, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* y tratados con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. El 50% de los animales tratados no preservaba la función auditiva, mientras que el otro 50% sí conservaba los umbrales de audición de normoacusia de los ratones WT. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 6-8 animales por grupo. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-*Null*.

Así pues, este estudio mostró que la administración IC del vector AAV9-*Naglu* era capaz de prevenir la pérdida de audición característica de la MPSIIIB. En conjunto, los resultados observados sugerían que la no conservación de la citoarquitectura coclear, sobre todo del epitelio sensorial del órgano de Corti, se correlacionaría con la no preservación de la función auditiva en, aproximadamente, el 50% de los ratones tratados. Sin embargo, se observó que el otro 50% restante de los animales tratados sí conservaba dicha citoarquitectura de la cóclea, lo que conllevaría a la preservación de la función auditiva. No obstante, la dosis administrada fue de  $9.3 \times 10^9$  vg, designada como “mínima terapéutica” en la primera parte de este trabajo, por lo que, probablemente, la administración de dosis más elevadas (como la de  $2.0 \times 10^{10}$  vg) conseguiría la conservación de la función auditiva en la mayoría de los ratones tratados.

***Parte 3. Evaluación de la función visual tras  
el tratamiento de ratones MPSIIIB  
con el vector AAV9-Naglu***



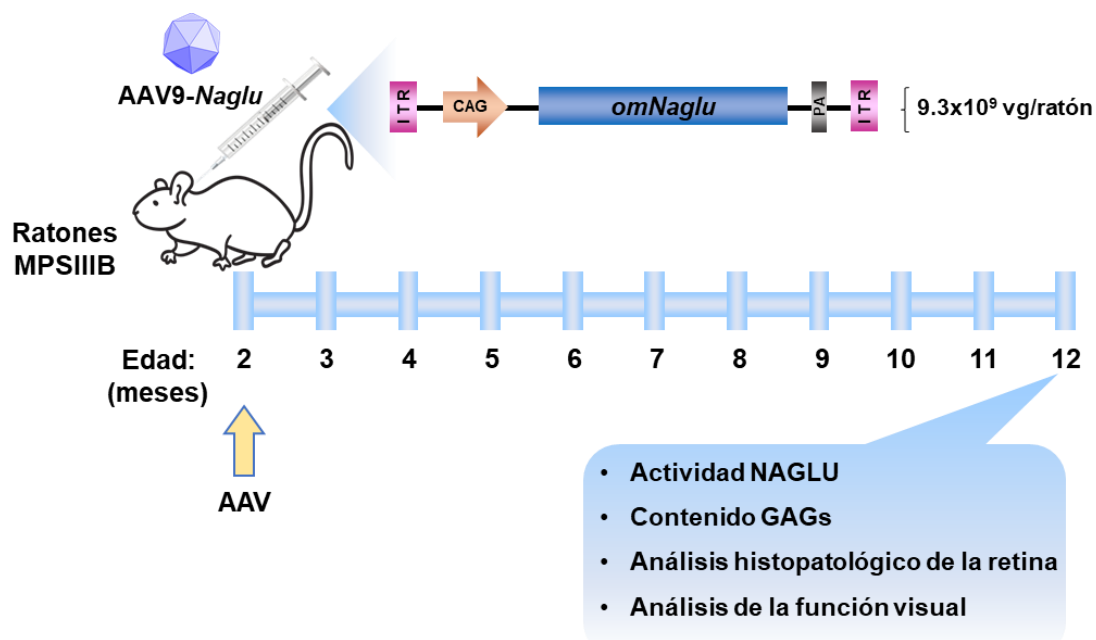


En la tercera parte de este trabajo, se estudió si este tratamiento con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector *AAV9-Naglu* también podía contrarrestar las alteraciones de otra de las funciones sensoriales afectadas, la función visual, en ratones MPSIIIB. Está descrito que los pacientes de MPSIIIB presentan alteraciones visuales entre las que se destaca la degeneración de la retina (*Leung, 1971*). Además, también se ha descrito que el modelo murino recapitula esta característica de la enfermedad en pacientes humanos (*Heldermon, 2007; Tse, 2015*), convirtiéndolo en un buen modelo en el que evaluar el efecto de una terapia.

## **1. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO A LARGO PLAZO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR *AAV9-Naglu* SOBRE LA FUNCIÓN VISUAL**

La degeneración de la retina en los ratones MPSIIIB es progresiva y se inicia a partir de los 7 meses de edad. Cuando los animales ya cuentan con 1 año, la patología ocular está totalmente establecida, pues la pérdida neuronal es de aproximadamente el 50% (*Tse, 2015*). Por ello, se decidió evaluar el efecto terapéutico del tratamiento intra-OCR con el vector *AAV9-Naglu* transcurridos 10 meses desde su administración.

Con dicho fin, a ratones MPSIIIB de 2 meses de edad se les administró por vía intracisterna magna el vector *AAV9-Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. A los 12 meses de edad, se analizó la actividad enzimática NAGLU, el contenido de GAGs, parámetros histológicos en diferentes partes del ojo y la función visual. En el estudio, también se incluyeron ratones WT, MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null* a la misma dosis. En la **Figura 33** se presenta un esquema del diseño experimental de este estudio a largo plazo de la función visual en animales MPSIIIB tratados con nuestra aproximación de terapia génica.



**Figura 33. Diseño experimental para la evaluación del efecto terapéutico a largo plazo de la administración intracisterna del vector AAV9-Naglu sobre la función visual.** A ratones MPSIIIB de 2 meses de edad, se les administró por vía cisterna magna directamente al LCR el vector viral AAV9-Naglu a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg y se evaluaron los efectos del tratamiento transcurridos 10 meses desde la inyección. Se evaluaron los niveles de actividad NAGLU y el contenido de GAGs. También se realizó un análisis histopatológico del ojo y se determinó la funcionalidad visual.

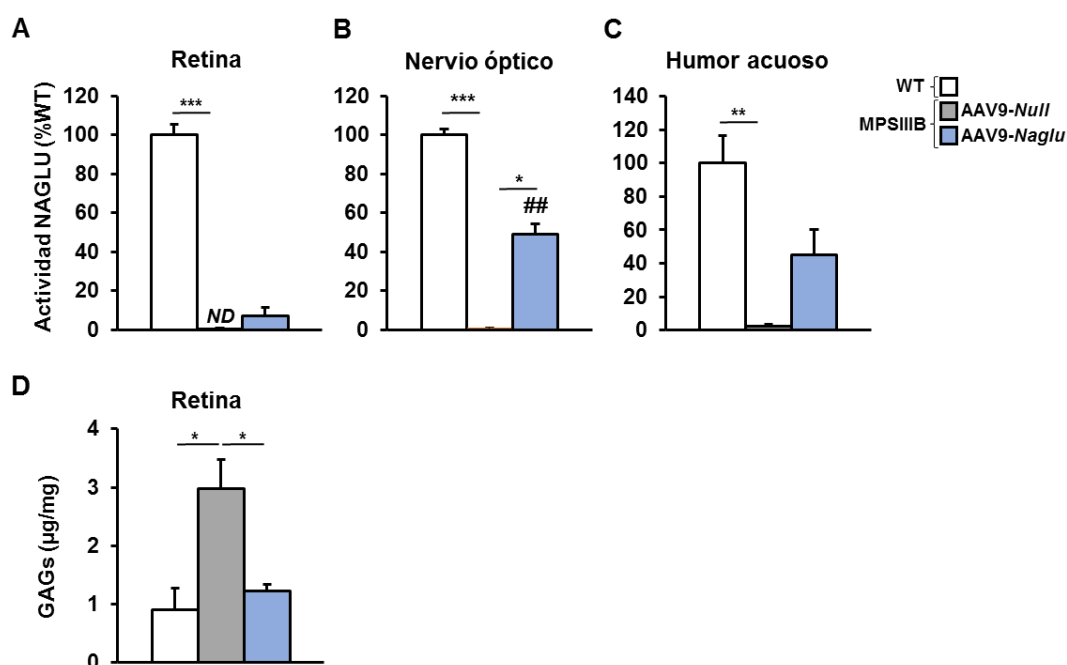
### 1.1. Aumento de la actividad NAGLU en el ojo y corrección a largo plazo del contenido de GAGs en la retina

En primer lugar, se analizaron los niveles de actividad NAGLU en el ojo y se observó que éstos eran prácticamente indetectables en la retina, el humor acuoso y el nervio óptico de ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null (**Figura 34A-C**). Sin embargo, en los ratones MPSIIIB tratados con el vector AAV9-Naglu, se produjo un aumento de estos niveles de actividad NAGLU, siendo este incremento del 10% respecto a animales WT en la retina y alrededor de un 50% respecto a los niveles de animales sanos tanto en el nervio óptico como en el humor acuoso (**Figura 34A-C**).

A continuación, se analizó el contenido de GAGs y se detectó un incremento significativo de éste en la retina de los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null. En cambio, en los ratones MPSIIIB tratados con el vector terapéutico, se producía la normalización de dicho acúmulo patológico, llegando a alcanzar niveles equiparables a los de animales sanos. Esto indicaba que la presencia de tan sólo un 10% de actividad NAGLU en la retina respecto a ratones WT era suficiente para corregir la acumulación lisosomal en este tejido (**Figura 34D**). No obstante, no se podría

descartar que la actividad NAGLU detectada en el nervio óptico y el humor acuoso también pudieran contribuir a la normalización del contenido de GAGs en la retina por medio de la difusión de la proteína NAGLU o por su transporte por transcitosis.

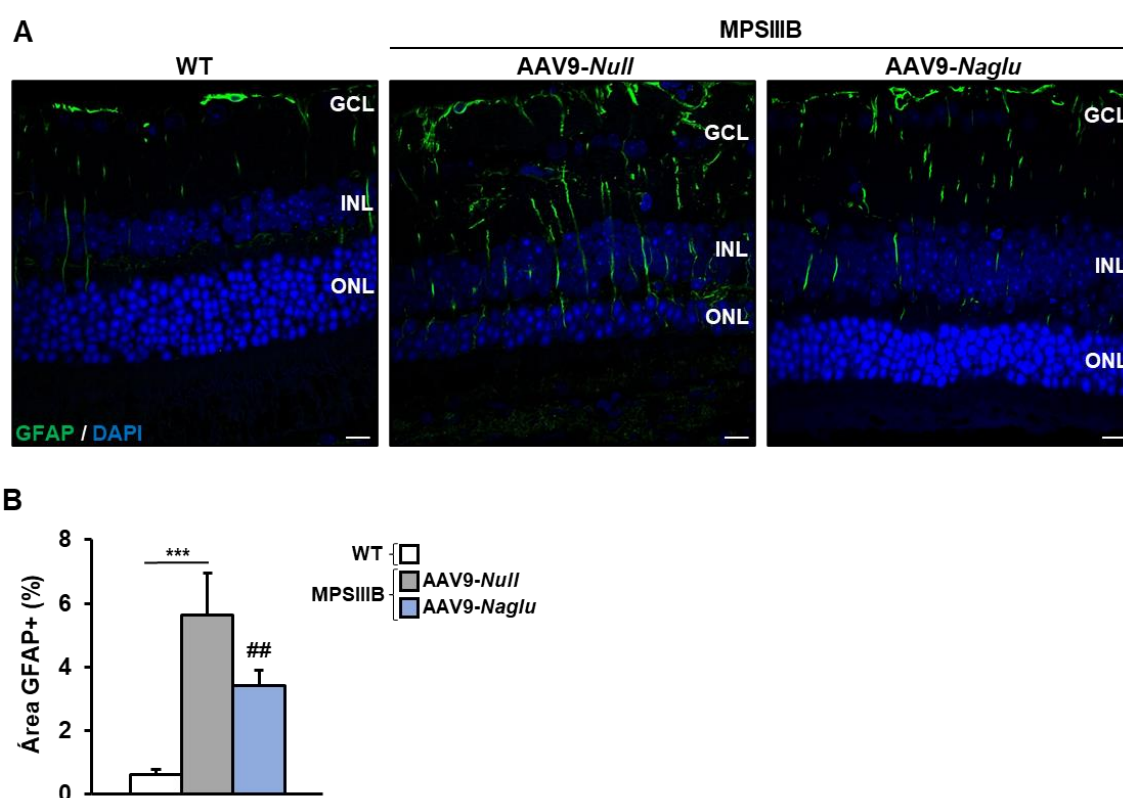
Paralelamente al estudio del contenido de GAGs en la retina, también se evaluó la distensión lisosomal gracias a análisis inmunohistoquímicos contra la proteína LIMP2 (*Lysosomal Integrated Membrane Protein 2*), una proteína integral de la membrana de los lisosomas, que representa un buen marcador de la distensión lisosomal. Se observó que la señal LIMP2 positiva estaba significativamente aumentada en la retina de los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null respecto a los ratones WT (**Figura 35A,B**), indicativo de distensión lisosomal en la retina de los ratones enfermos a los 12 meses de edad. En cambio, la distensión lisosomal en la retina de los ratones tratados con el vector AAV9-Naglu estaba completamente corregida, pues la señal positiva de LIMP2 era prácticamente indetectable en el análisis inmunohistoquímico (**Figura 35A**). La cuantificación de esta señal reveló que los niveles en los ratones tratados con el vector terapéutico eran indistinguibles con los de ratones WT (**Figura 35B**). Estos resultados estaban de acuerdo con los observados en la cuantificación del contenido de GAGs en este tejido (**Figura 34D**), confirmando que se producía una corrección completa de la acumulación patológica de GAGs en la retina de los ratones tratados con el vector AAV9-Naglu.



**Figura 34. Actividad NAGLU en el ojo y corrección a largo plazo del contenido de GAGs en la retina.** Determinación de los niveles de actividad NAGLU en el ojo y cuantificación del contenido de GAGs en la retina de ratones WT, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-Null y tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del AAV9-Naglu, tras 10 meses de tratamiento. (A-C) Actividad NAGLU en la retina, el nervio óptico y el humor acuoso. (D) Contenido de GAGs en la retina. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-7 animales por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-Null. ## $p < 0.01$  vs. WT.



de evaluar el efecto del tratamiento a largo plazo con el vector AAV9-*Naglu* sobre la gliosis de la retina, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico contra la proteína GFAP, que se expresa en las células de Müller. Otros estudios publicados han puesto de manifiesto que no se aprecian diferencias significativas en la gliosis de la retina de animales sanos y MPSIIIB (Tse, 2015). Por el contrario, en el presente estudio, se observó que la señal positiva para GFAP estaba significativamente elevada en los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* en comparación con los animales WT, lo que denotaba una gliosis reactiva en la retina de este modelo animal (Figura 36). Sin embargo, en las inmunohistoquímicas de ratones MPSIIIB tratados con el vector AAV9-*Naglu*, se apreciaba una clara disminución de la señal positiva para GFAP. La cuantificación de esta señal confirmó que este grupo de ratones MPSIIIB tratados presentaba una disminución significativa (alrededor del 40%) de la gliosis tras 10 meses de tratamiento (Figura 36).



**Figura 36. Evaluación del efecto terapéutico del vector AAV9-*Naglu* sobre la gliosis en la retina.** Determinación de los niveles de gliosis en la retina de ratones WT, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* y tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector AAV9-*Naglu*. **(A)** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas contra GFAP que mostraron una disminución de la gliosis retiniana en el grupo de tratamiento. **(B)** Cuantificación de la señal positiva para GFAP. GCL: *Ganglion Cell Layer* (capa de células ganglionares), ONL: *Outer Nuclear Layer* (capa nuclear externa), INL: *Inner Nuclear Layer* (capa nuclear interna). Los resultados mostrados en el histograma corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-9 animales por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIB-*Null*. ## $p < 0.01$  vs. WT. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m.

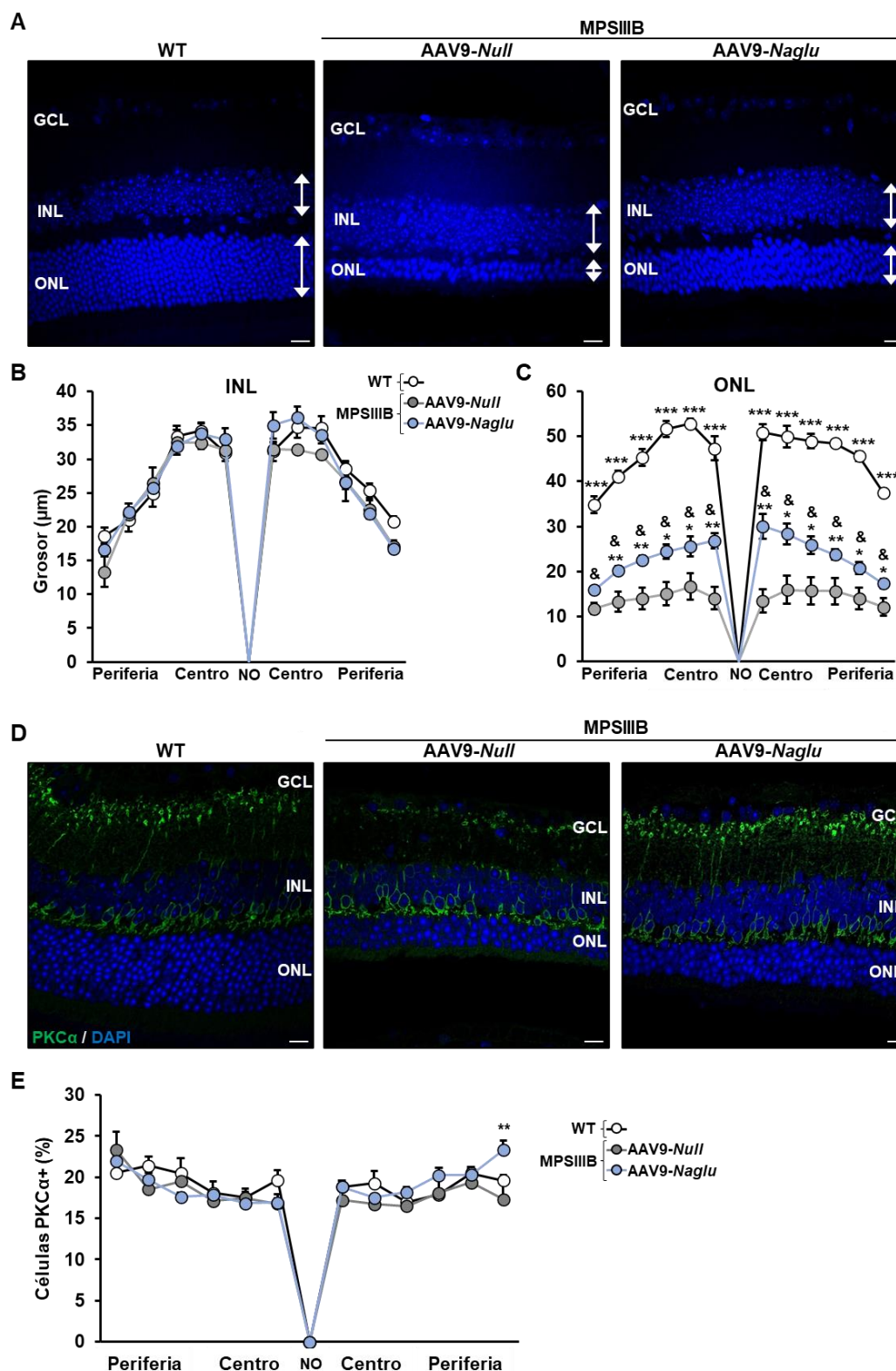
### 1.3. Prevención de la pérdida neuronal en la retina

En el modelo murino de la MPSIIIB, alrededor del 50% de los fotorreceptores se han perdido cuando los animales tienen un año de edad, siendo la pérdida de los bastones mayor que la de los conos. Además, las células bipolares, las neuronas del segundo nivel de sinapsis en la fototransducción, también presentan una pérdida superior al 50% a esta edad (Tse, 2015).

La pérdida de neuronas de la retina es irreversible, por lo que el objetivo de este tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis mínima terapéutica pretendía determinar si su administración a ratones MPSIIIB de 2 meses de edad era capaz de prevenir la neurodegeneración progresiva de la retina, al administrar el vector a una edad temprana donde aún no ha habido pérdida neuronal.

Con la finalidad de evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento en la prevención de la pérdida neuronal en la retina, en primer lugar, se analizó el grosor de las capas nucleares retinianas de ratones WT, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* y tratados con el vector AAV9-*Naglu*. Para ello, se midió el grosor de las capas nucleares INL (*Inner Nuclear Layer*) y ONL (*Outer Nuclear Layer*) en regiones centrales y periféricas de la retina. El análisis demostró que no había cambios en el grosor de la INL entre los distintos grupos experimentales (**Figura 37A,B**). Además, el estudio inmunohistoquímico contra la proteína *Protein Kinase C  $\alpha$*  (PKC $\alpha$ ), expresada en las células bipolares y que representa un buen marcador específico de éstas, mostró que no se producía una pérdida de dichas células (**Figura 37D,E**) de la retina de los animales administrados con el vector AAV9-*Null*. Esto difería con lo publicado por otros autores, donde han indicado que sí existen diferencias significativas en el grosor de la INL de ratones WT y MPSIIIB (Tse, 2015).

En cambio, sí que se observó que la ONL de los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* era significativamente más delgada que la de los ratones WT, tanto en la periferia, como el centro de la retina (**Figura 37A,C**). No obstante, se evidenció que el grosor de esta capa nuclear de la retina de ratones MPSIIIB tratados con el vector AAV9-*Naglu* presentaba valores intermedios entre los de los ratones MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* y los de la retina de animales WT, lo que sugería una preservación parcial de las neuronas residentes de esta capa gracias al tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* (**Figura 37A,D**).



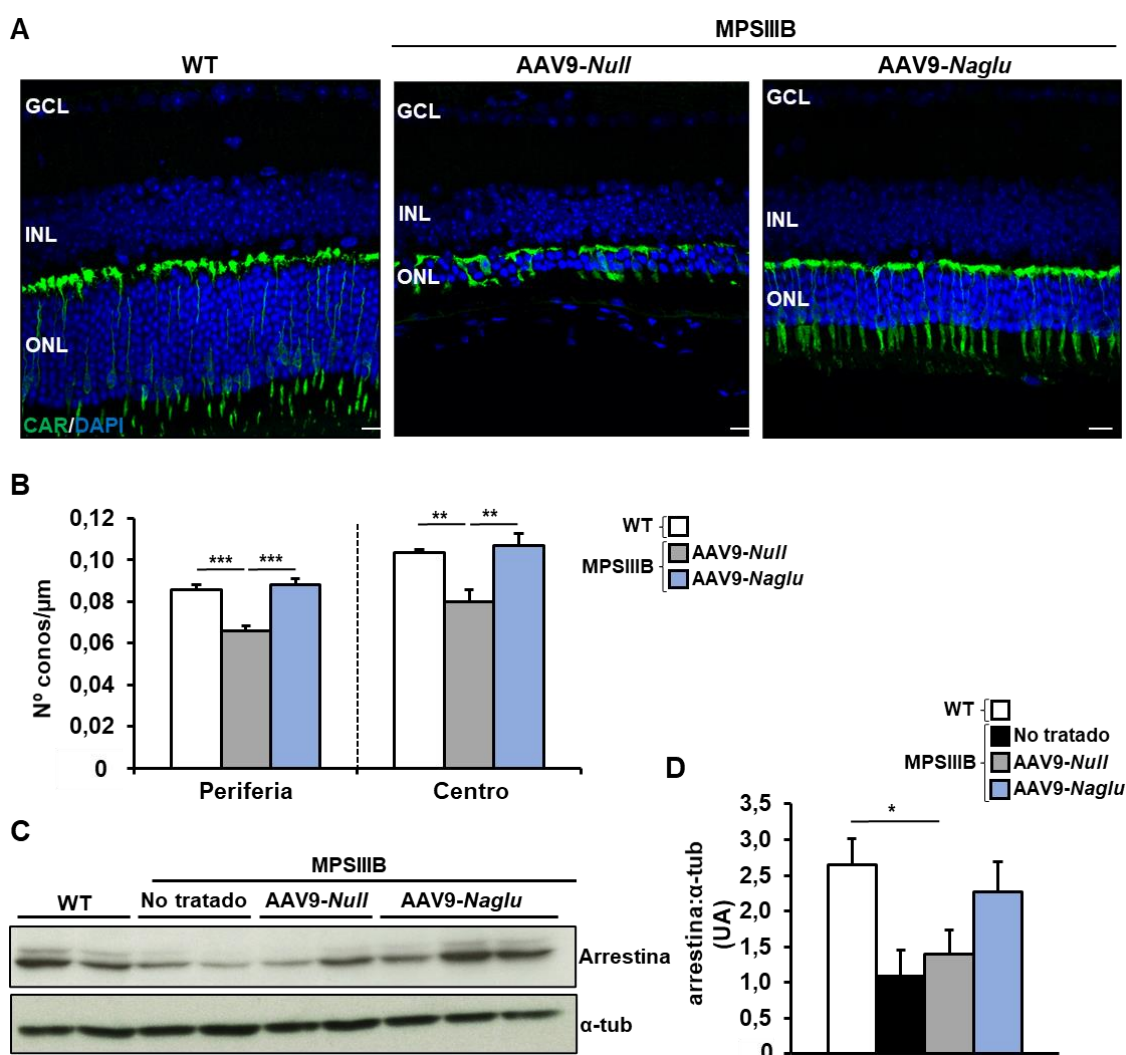
**Figura 37. Prevención de la neurodegeneración en las capas nucleares de la retina.** Análisis de la neurodegeneración en la retina de ratones WT, MPSIIIIB administrados con el vector AAV9-Null y tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector AAV9-Naglu. **(A)** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas de retinas con marcaje DAPI. Cuantificación del grosor de la INL **(B)** y de la ONL **(C)**. **(D)** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas contra PKC $\alpha$ . **(E)** Cuantificación de células bipolares positivas para el marcaje PKC $\alpha$ . GCL: *Ganglion Cell Layer* (capa de células ganglionares), ONL: *Outer Nuclear Layer* (capa nuclear externa), INL: *Inner Nuclear Layer* (capa nuclear interna), NO: nervio óptico. Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-9 animales por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIIB-Null. & $p < 0.001$  vs. WT. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m.



#### 1.4. Prevención de la pérdida de fotorreceptores en la retina

La observación de una conservación parcial de las células de la ONL a largo plazo motivó el estudio del efecto del tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* sobre cada uno de los tipos celulares presentes en dicha capa.

Seguidamente, se llevó a cabo el estudio de los conos mediante un análisis inmunohistoquímico contra la arrestina (*Cone Arrestin*), una proteína específica de este tipo celular. Se observó que, a los 12 meses de edad, los ratones MPSIIIB administrados con el vector *AAV9-Null* presentaban una disminución en el número de conos a lo largo de toda la longitud de la ONL (**Figura 38A, B**), evidenciando la pérdida de este tipo celular en la retina de estos ratones MPSIIIB de edad avanzada. En cambio, a esa misma edad, los ratones MPSIIIB tratados con el vector *AAV9-Naglu* no mostraban diferencias en el número de conos respecto a animales WT, tanto en la periferia como en el centro de la retina. Esto indicaba que no se perdía este tipo celular tras 10 meses de tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* (**Figura 38A,B**). Para confirmar este resultado, se llevó a cabo la cuantificación del contenido de arrestina en extractos proteicos de retinas de los distintos grupos experimentales mediante un análisis por *Western blot*. Este análisis reveló que las retinas de los ratones MPSIIIB no tratados y administrados con el vector *AAV9-Null* presentaban una reducción significativa de los niveles de arrestina en comparación a los animales sanos, mientras que el contenido de esta proteína en las retinas del grupo de ratones tratados con el vector terapéutico se mantenía a niveles prácticamente indistinguibles a los observados en ratones WT (**Figura 38C,D**). Así pues, estos resultados evidenciaban una pérdida de conos en ratones MPSIIIB, mientras que el tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* permitía la preservación a largo plazo de este tipo neuronal.

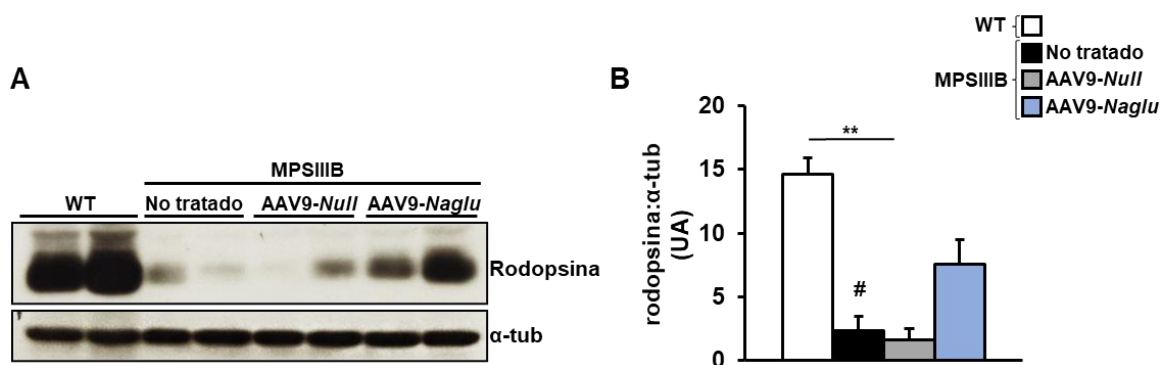


**Figura 38. Evaluación del efecto terapéutico del vector AAV9-Naglu sobre la pérdida de conos en la ONL.** Determinación de la cantidad de conos en la ONL de la retina de ratones WT, MPSIIIIB administrados con el vector AAV9-Null y tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector AAV9-Naglu. **(A)** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas contra arrestina en retinas. **(B)** Cuantificación del número de conos en la retina tras 10 meses de tratamiento con el vector AAV9-Naglu. Los resultados mostrados en los histogramas corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-7 animales por grupo. **(C)** El análisis por *Western blot* para la arrestina. **(D)**. Cuantificación del contenido de arrestina mediante el análisis de la densitometría obtenida en el *Western blot*. Los resultados mostrados en el histograma corresponden a la media  $\pm$  SEM de 2-3 animales por grupo. GCL: *Ganglion Cell Layer* (capa de células ganglionares), ONL: *Outer Nuclear Layer* (capa nuclear externa), INL: *Inner Nuclear Layer* (capa nuclear interna),  $\alpha$ -tub:  $\alpha$ -tubulina (proteína constitutiva). \* $p < 0.05$  vs. MPSIIIIB-Null. Barra de escala para las fotos: 20  $\mu$ m.

Paralelamente, también se estudió el efecto del tratamiento a largo plazo sobre la pérdida de bastones en la ONL. Para ello, en extractos proteicos de retina se llevó a cabo un análisis por *Western blot* contra la rodopsina, una proteína específica de este tipo celular. Se observó que los ratones MPSIIIIB no tratados y administrados con el vector AAV9-Null presentaban niveles muy bajos de esta proteína en comparación con

ratones WT, mientras que los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu* preservaban parcialmente el contenido de esta proteína (**Figura 39**).

El conjunto de estos resultados reveló el efecto terapéutico a largo plazo del tratamiento con el vector AAV9-*Naglu*, administrado a la dosis designada como la “mínima terapéutica” ( $9.3 \times 10^9$  vg), sobre la prevención en la pérdida de fotorreceptores de la retina de ratones MPSIIIB. Se demostró que la administración de este vector viral evitaba la pérdida de conos y prevenía parcialmente la degeneración de bastones tras 10 meses de tratamiento.



**Figura 39. Efecto del tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* sobre la pérdida de bastones en la ONL de la retina.** Determinación de la cantidad de rodopsina en retinas de ratones WT, MPSIIIB administrados con el vector AAV9-*Null* y tratados con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. (A) Análisis por *Western blot* del contenido de rodopsina tras 10 meses de tratamiento. (B) Cuantificación del contenido de rodopsina mediante el análisis de la densitometría obtenida en el *Western blot*. Los resultados mostrados en el histograma corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-6 animales por grupo.  $\alpha$ -tub:  $\alpha$ -tubulina (proteína constitutiva). \*\* $p < 0.01$  vs. MPSIIIB-*Null*. # $p < 0.05$  vs. WT.

### 1.5. Efecto del tratamiento IC con el vector AAV9-*Naglu* sobre la función visual

Dado el mantenimiento de los fotorreceptores en ratones MPSIIIB tratados, a continuación, se evaluó si esta terapia génica era capaz de mejorar la capacidad visual de ratones MPSIIIB, 10 meses después de la administración del vector AAV9-*Naglu*. Se pretendía estudiar si dicha preservación de conos y bastones era suficiente para prevenir la pérdida de visión detectada en este modelo animal. Para ello, se sometieron a los distintos grupos experimentales de ratones a diversas pruebas que permitieran evaluar la funcionalidad visual de los animales.

En primer lugar, se analizó la respuesta eléctrica de la retina. Para ello, se sometieron los distintos grupos experimentales a un electroretinograma (ERG). Este test permite evaluar de manera no invasiva la función retiniana mediante la cuantificación de los estímulos eléctricos producidos por las células de la retina frente a

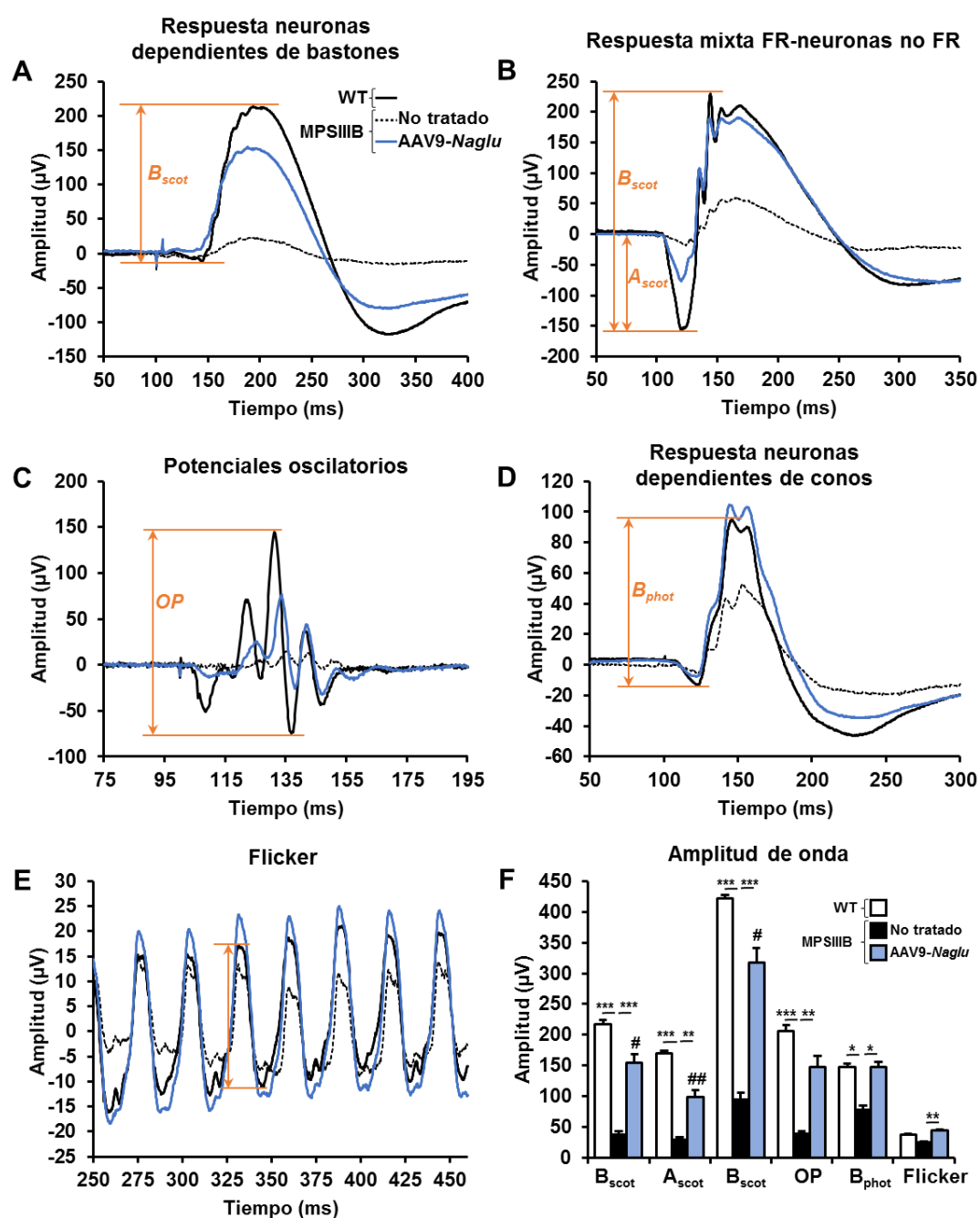
diferentes estímulos lumínicos. El ERG puede usarse para medir la respuesta eléctrica tanto en condiciones de baja luminosidad (escotópicas) como de alta luminosidad (fotópicas). En condiciones escotópicas, los ratones, previamente adaptados a la oscuridad, son expuestos a flashes con baja intensidad lumínica para inducir la activación de los bastones y medir su funcionalidad y la de las neuronas con las que hacen sinapsis. En condiciones fotópicas, los ratones que han sido adaptados a condiciones de luz intensa son expuestos a flashes con una alta intensidad lumínica. De esta manera, se puede medir la función de los conos y de las neuronas que continúan transmitiendo el estímulo eléctrico (*Benchorin, 2017*). La adaptación a las distintas condiciones lumínicas es imprescindible, pues minimiza la respuesta de los fotorreceptores que no son específicos de éstas y maximiza la respuesta de los que sí son específicos de las mismas (*Benchorin, 2017*).

Estos parámetros de realización del ERG permiten calcular la amplitud y el tiempo que se tarda en alcanzar el pico de las dos ondas mayoritarias en los estímulos eléctricos producidos por la retina: la onda-a (*a-wave*) y la onda-b (*b-wave*). La onda-a es una medida de la respuesta inicial de los fotorreceptores a flashes breves de luz, mientras que la onda-b mide la respuesta de las neuronas que continúan la transmisión del estímulo eléctrico (*Benchorin, 2017*). La pérdida de amplitud en ambas ondas se puede atribuir a diversas distrofias de retina, mientras que un incremento anormal de la amplitud de las mismas ha sido atribuido a distrofias de conos (*Phillips, 2010*).

Los resultados de este test mostraron una disminución en la amplitud de todas las ondas analizadas en los ratones MPSIIIB no tratados, que estaría de acuerdo con la pérdida de fotorreceptores descrita en este modelo animal. Sin embargo, los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu* mostraron un aumento de la amplitud de todas las ondas analizadas (**Figura 40**). Los resultados obtenidos indicaban que las neuronas dependientes de los fotorreceptores presentaban una preservación de la respuesta eléctrica en los ratones tratados, aunque dicha conservación fue total en la que dependía de los conos y parcial en la que dependía de los bastones (**Figura 40A,D**). Esto estaba de acuerdo con lo observado en la conservación de fotorreceptores en los análisis inmunohistoquímicos, ya que era parcial para los bastones y total para los conos (**Figuras 38 y 39**). También, se observó que las ondas que reflejaban la respuesta mixta de fotorreceptores ( $A_{scot}$ ) y neuronas que dependen de éstos ( $B_{scot}$ ) presentaban una recuperación en la amplitud de onda, siendo total en la  $B_{scot}$  y parcial en la  $A_{scot}$  (**Figura 40B**). En relación a los potenciales oscilatorios (OP), representativos de la respuesta combinada frente a condiciones fotópicas y escotópicas, fruto de la interacción entre conos y bastones, también se observó una conservación parcial de la amplitud de onda

en el grupo de tratamiento con el vector AAV9-*Naglu* (**Figura 40C**). El flicker, una prueba que representa la capacidad de recuperación de los conos frente a estímulos repetitivos de alta intensidad lumínica, puso de manifiesto que los ratones MPSIIIB tratados conservaban dicha capacidad en su totalidad, mientras que la recuperación de los conos frente a estos estímulos era menos eficiente en los ratones MPSIIIB no tratados (**Figura 40E**).

En resumen, la cuantificación de la amplitud de onda del ERG indicó una conservación parcial de la respuesta eléctrica dependiente de los bastones y preservación de la que dependía de los conos en ratones MPSIIIB tratados con AAV9-*Naglu* (**Figura 40F**), indicando que los fotorreceptores que se mantenían eran funcionales.



**Figura 40. Electroretinograma de ratones.** Evaluación del efecto del tratamiento a largo plazo de ratones MPSIIIIB con el vector AAV9-Naglu a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg en la respuesta eléctrica de la retina. **(A)** Respuesta eléctrica de neuronas que hacen sinapsis con los bastones. **(B)** Respuesta eléctrica mixta de fotorreceptores (FR) y neuronas no fotorreceptoras. **(C)** Potenciales oscilatorios que representan la respuesta combinada de conos y bastones frente a condiciones fotópicas y escotópicas. **(D)** ERG de neuronas que hacen sinapsis con los conos. **(E)** Ondas representativas del flicker. **(F)** Resumen del ERG, representado en histogramas, frente a distintos estímulos lumínicos. Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5-9 animales por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSIIIIB no tratado. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. WT.

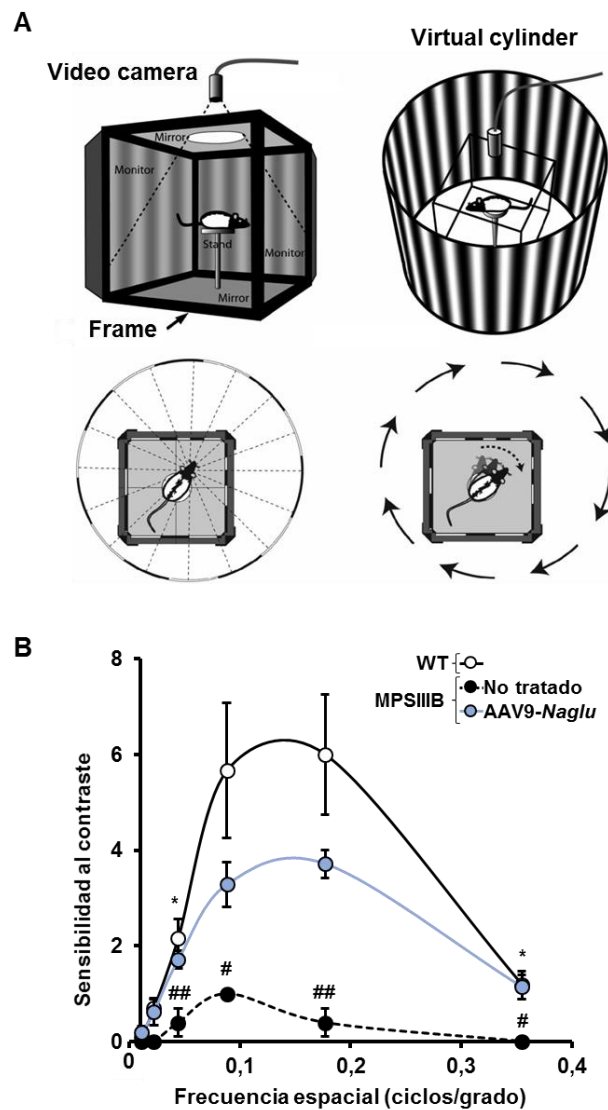
Dado que los resultados obtenidos en el ERG demostraron que los fotorreceptores que se conservan a largo plazo en los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu* eran funcionales, se estudió si la preservación de la respuesta eléctrica en la retina se traducían en la conservación de la función visual en estos animales. Para ello, se llevaron a cabo 2 tests que permitieron evaluar la agudeza visual: el *Optomotor Response* (OR) y el *Visual Water Task* (VWT).

El OR tiene como objetivo evaluar la agudeza visual mediante el análisis de sensibilidad al contraste, ya que permite medir el reflejo optoquinético. Este reflejo es involuntario e innato, por lo que su estudio no requiere de aprendizaje por parte del ratón ni de preparación por parte del investigador, sino que se puede medir desde los primeros días de experimentación (*Prusky, 2004*). Por tanto, el análisis del reflejo optoquinético de manera correctamente estandarizada permite obtener información sobre el sistema visual del ratón. Este test consiste en un cubo cuyo interior se denomina *arena*. En el centro de la arena hay una plataforma elevada donde se deposita al ratón. Las paredes laterales se componen de monitores LED que emiten un patrón de gradilla de barras verticales blancas y negras que giran alrededor del ratón a frecuencia y contraste variables. La parte interior de la tapa inferior del cubo es un espejo. En la tapa superior hay un orificio con una cámara que capta los movimientos del ratón. La cámara está conectada a un ordenador con un software que detecta e interpreta los movimientos de la cabeza del ratón mientras éste es capaz de discernir entre las barras blancas y negras (**Figura 41A**). Cuando el patrón de barras gira a una velocidad a la que el animal ya no distingue entre blancos y negros, o alcanza un contraste con el que no se pueden diferenciar las barras oscuras de las claras, el movimiento de la cabeza del ratón es aleatorio hacia cualquier zona del cubo indistintamente, ya que es incapaz de diferenciar el patrón de barras (*Shi, 2018*).

Ratones WT, MPSIIIB no tratados y tratados con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg fueron sometidos a esta prueba. Tras su realización, se observó que los ratones MPSIIIB no tratados de 12 meses de edad presentaban menor sensibilidad al contraste en todas las frecuencias analizadas en comparación con ratones WT. En cambio, los ratones tratados eran capaces de conservar completamente la sensibilidad al contraste a frecuencias bajas y altas, mientras que, a frecuencias intermedias, la preservación de la sensibilidad al contraste era parcial (**Figura 41B**). Ello indicó que, de manera general, se daba una preservación parcial de la agudeza visual a largo plazo en los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu*. Esto estaba de acuerdo con los resultados observados anteriormente, donde no se observaba una conservación total ni de la respuesta eléctrica de la retina (ERG) (**Figura 40**), ni del contenido de rodopsina

(Figura 39), pero se conseguía una mejora significativa de la agudeza visual a largo plazo.

No obstante, la preservación parcial de la agudeza visual a largo plazo tras el tratamiento IC con el vector AAV9-Naglu, reflejada en los resultados obtenidos con el test OR, estaba también de acuerdo con la conservación parcial de los fotorreceptores observada anteriormente (Figuras 37, 38 y 39).



**Figura 41. Análisis de la agudeza visual a largo plazo mediante el test *Optomotor Response* (OR).** La determinación de la agudeza visual se llevó a cabo mediante la evaluación de la sensibilidad al contraste de ratones sanos, MPSIIIIB no tratados y tratados con el vector AAV9-Naglu a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg. **(A)** Representación esquemática del aparato del OR donde se distinguen los distintos elementos que lo conforman. Adaptado de Prusky, 2000. **(B)** Análisis de la agudeza visual mediante la evaluación de la sensibilidad al contraste a distintas frecuencias. Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-7 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs. MPSIIIIB no tratado. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. WT.



Asimismo, también se sometieron a los ratones de los distintos grupos experimentales al *Visual Water Task* (VWT), otra prueba para evaluar la agudeza visual y complementar las observaciones obtenidas con el test OR. A diferencia del test OR, el VWT, además de la agudeza visual, también analiza el aprendizaje, ya que requiere de un período de entrenamiento del animal. Dado que los roedores son nadadores instintivos, se evalúa la agudeza visual de éstos en relación con su inclinación a escapar del agua hasta una plataforma sólida sumergida (*Prusky, 2000*).

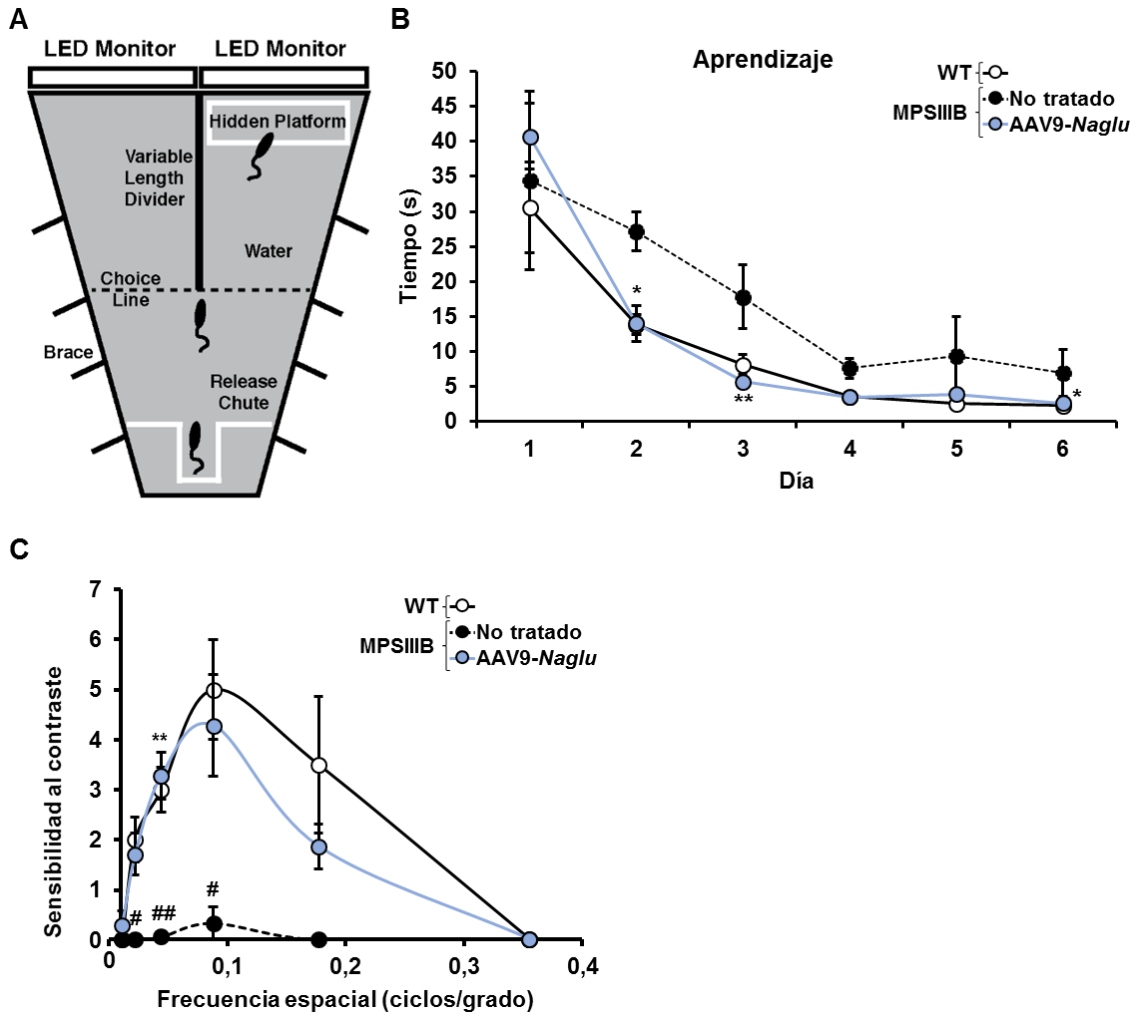
Esta prueba consiste en un tanque de forma trapezoidal lleno de agua en cuyo extremo más ancho hay dos monitores LED idénticos en los que se emiten imágenes distintas: uno emite una imagen gris homogénea y el otro, una imagen de gradilla de barras verticales blancas y negras. Esta imagen va variando en frecuencia y contraste (**Figura 42A**). La pared divisoria que separa ambos monitores delimita la línea de elección (*choice line*), punto del tanque en el que los ratones deben decidir hacia qué monitor dirigirse. Frente al monitor que emite la imagen de gradilla se encuentra la plataforma sólida (levemente sumergida en el agua) hacia la que los ratones deberán nadar para ponerse a salvo. Esta prueba pretende analizar la capacidad de los ratones de discriminar entre la imagen de gradilla y el gris homogéneo (sensibilidad al contraste), lo que permite evaluar, por un lado, la agudeza visual de éstos y, por otro, la asociación y el aprendizaje entre la imagen de gradilla y que, justo debajo del monitor que la emite, está la plataforma.

Esta prueba de VWT consta de dos fases: el aprendizaje y la evaluación de agudeza visual. Durante la fase de aprendizaje, se deja al ratón en el centro del extremo estrecho del tanque (**Figura 42A**) y se mide el tiempo que tarda éste en llegar a la plataforma sumergida frente a la pantalla LED que emite la imagen de gradilla. Esta operación se repite varias veces al día (véase Material y Métodos) durante una semana, gracias a lo que se evalúa si hay una disminución del tiempo hasta hallar la plataforma, es decir, se evalúan el aprendizaje y la agudeza visual conjuntamente. La finalidad de esta fase es que el animal se familiarice con la ubicación de la plataforma que está asociada a la imagen de la gradilla. Finalmente, en la fase de evaluación de la agudeza visual, se analiza cuál es el límite de sensibilidad al contraste mediante la repetición del examen. En cada intento, se va aumentando la frecuencia y variando el contraste a la que se emite la gradilla de barras verticales blancas y negras con el objetivo de determinar cuál es el límite de agudeza visual en el que los ratones son incapaces de distinguir entre la gradilla y el gris homogéneo (*Prusky, 2000*).

Durante la fase de entrenamiento, se observó que todos los ratones de los distintos grupos experimentales presentaron un claro aprendizaje, ya que el tiempo medio en llegar a la plataforma disminuía a medida que se repetía el test (**Figura 42B**). Sin embargo, los ratones MPSIIIB no tratados, aunque presentaban cierto nivel de aprendizaje, mostraban un tiempo en llegar a la plataforma mayor que el de ratones WT, ya que cometían más errores a la hora de encontrar la plataforma o bien tardaban más tiempo en escoger la dirección a la que ir una vez en la línea de elección (**Figura 42B**). En cambio, el aprendizaje de los ratones tratados con el vector *AAV9-Naglu* fue indistinguible del mostrado por los ratones WT, lo que indicaba claramente una preservación de la capacidad de aprendizaje y de la agudeza visual a largo plazo tras el tratamiento con el vector terapéutico (**Figura 42B**).

Durante la evaluación de la agudeza visual, los ratones MPSIIIB no tratados mostraron niveles de sensibilidad al contraste, es decir, de agudeza visual, significativamente inferiores frente a los ratones WT en todas las frecuencias analizadas (**Figura 42C**). Sin embargo, los ratones tratados con el vector *AAV9-Naglu* mantenían los niveles de sensibilidad al contraste similares a los de los ratones sanos (**Figura 42C**), de manera análoga a lo observado con el test OR. A frecuencias bajas, los valores de agudeza visual de ratones WT y tratados con el vector terapéutico eran indistinguibles, mientras que, a frecuencias más elevadas, los niveles de agudeza visual de los ratones tratados eran más bajos que de los de ratones sanos. Estos resultados confirmaban la preservación de la agudeza visual a largo plazo observada también durante la fase de entrenamiento y en el test OR.

Por tanto, el conjunto de los resultados obtenidos tras el análisis de la función visual demostró el efecto terapéutico a largo plazo de la administración IC del vector *AAV9-Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg en la preservación de la agudeza visual de ratones MPSIIIB.



**Figura 42. Evaluación de la agudeza visual mediante la prueba *Visual Water Task* (VWT).** Determinación de la agudeza visual mediante el análisis del aprendizaje y de la sensibilidad al contraste en el VWT de ratones WT, MPSIIIB no tratados y tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector AAV9-Naglu. **(A)** Representación esquemática del tanque trapezoidal del aparato VWT en el que se indican las distintas partes que lo componen. Adaptado de Prusky, 2000. **(B)** Fase de aprendizaje donde se mide el tiempo requerido por los ratones para alcanzar la plataforma oculta. **(C)** Análisis de la agudeza visual mediante el estudio de la sensibilidad al contraste. Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-7 animales por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. MPSIIIB no tratado. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. WT.

## ***V. Discusión***



La MPSIIIB es una enfermedad rara de acúmulo lisosomal causada por la deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU). Esta enfermedad está caracterizada, principalmente, por una grave afectación del SNC. Esta afectación está marcada por una severa y progresiva neurodegeneración y neuroinflamación, las cuales vienen acompañadas por afectaciones periféricas moderadas. Con el transcurso de la enfermedad, los pacientes también desarrollan afectaciones otológicas y oculares entre las que se encuentran la pérdida de la citoarquitectura coclear y la degeneración de la retina. Estas afectaciones neurosensoriales provocan una marcada hipoacusia y una severa pérdida de la visión entre los pacientes.

En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio utilizando el ratón modelo de la enfermedad, se demostró la eficacia de una aproximación de terapia génica basada en una única administración intracisterna magna (IC) directamente al líquido cefalorraquídeo (LCR) de vectores AAV9 codificantes para la secuencia optimizada del gen murino *Naglu* (AAV9-*Naglu*). En dicho estudio, se observó, en el ratón MPSIIIB, la corrección de las principales afectaciones neurológicas y periféricas (Ribera, 2015). No obstante, tanto los pacientes como el modelo murino de esta enfermedad presentan, además, alteraciones neurosensoriales que afectan a la función auditiva y a la función visual (Del Monte, 1983; Heldermon, 2007; Mesolella, 2013; Tse, 2015).

Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral se centró en el estudio del efecto terapéutico de dicha estrategia de terapia génica sobre las alteraciones neurosensoriales que afectan a las funciones auditiva y visual de dicho modelo animal.

Para ello, una primera parte del estudio se basó en la búsqueda de la dosis mínima terapéutica del vector viral AAV9-*Naglu* necesaria para alcanzar el mismo efecto terapéutico observado tras la administración del vector AAV9-*Naglu* a la dosis  $3.0 \times 10^{10}$  genomas virales (vg), empleada en el estudio anterior (Ribera, 2015). Se evaluó el efecto terapéutico de 4 dosis equidistantes entre sí del vector AAV9-*Naglu* tras su administración IC en ratones MPSIIIB de 2 meses de edad. Tras 4 meses de tratamiento, los ratones tratados mostraron una clara respuesta dosis-dependiente en el aumento de la actividad enzimática NAGLU a nivel del SNC. Aun así, la normalización del contenido de GAGs observado fue independiente de la dosis administrada. Esto puso de manifiesto que, a pesar de que las dosis más bajas sólo alcanzaban un aumento de la actividad NAGLU del 25% respecto a animales sanos en algunas regiones del encéfalo analizadas, estos niveles eran suficientes para recuperar el contenido normal de GAGs

en dicho órgano. Por tanto, el hecho de observar corrección de la patología lisosomal en el SNC, a pesar de alcanzar niveles de actividad NAGLU de tan sólo el 25% respecto a ratones WT, pone de manifiesto que no es necesario alcanzar niveles de actividad enzimática equiparables a los de animales sanos para dar lugar a la reversión de la patología neurológica de acumulación. Distintos estudios realizados en modelos animales de LSDs sugieren la existencia de un umbral mínimo de actividad enzimática a partir del cual la enzima lisosomal es capaz de corregir la acumulación patológica de los lisosomas (*Scheuler, 2004; Desnick, 2004; Donsante, 2007; Garcia 2007; Valstar, 2010b*). Este “umbral clínico” se sitúa alrededor del 5-10% de la actividad enzimática de un ratón sano. Por tanto, es habitual relacionar un umbral alrededor del 10% de actividad enzimática como mínima necesaria para corregir o ralentizar la patología lisosomal. La evolución más lenta observada en los pacientes de la MPSIIIB con variantes de fenotipo atenuado podría explicarse debido a la presencia de dicho “umbral clínico” (*Moog, 2007; Valstar, 2010b*), donde la actividad NAGLU residual sería capaz de revertir la acumulación anómala de GAGs y disminuir la progresión de la patología.

El análisis de la neuroinflamación de este modelo animal tras la administración de las diferentes dosis del vector AAV9-*Naglu* reveló también una respuesta dosis-dependiente. La marcada astrogliosis y microgliosis observada en los ratones MPSIIIB no tratados de 6 meses de edad disminuía de manera inversa al aumento de dosis tras 4 meses de tratamiento, siendo las 2 dosis más altas del estudio las que presentaban una mayor corrección tanto de la astrogliosis como de la microgliosis.

A nivel periférico, tras 4 meses de tratamiento con las distintas dosis del vector AAV9-*Naglu*, los niveles de actividad NAGLU hepáticos y circulantes aumentaron de manera dosis-dependiente. Dicho aumento llevó a una disminución del contenido de GAGs en todos los órganos y tejidos analizados con todas las dosis del vector administradas. Debe destacarse que la administración de las dosis más bajas del vector repercutió en una disminución parcial del contenido de GAGs en los tejidos analizados, mientras que la administración de las dosis más elevadas sí consiguió revertir la patología lisosomal en la mayoría de tejidos periféricos analizados.

Puesto que los pacientes de esta enfermedad presentan una leve hepatomegalia y/o esplenomegalia (*van de Kamp, 1981; Neufeld y Muenzer, 2001*), también se evaluó el efecto del tratamiento con las distintas dosis administradas en ambos parámetros. Este análisis demostró que, tras 4 meses de tratamiento, las distintas dosis administradas recuperaban la hepatomegalia por igual, mientras que la esplenomegalia sólo se recuperaba en los ratones tratados con las 2 dosis más elevadas del vector.

Por otra parte, el análisis del efecto de las distintas dosis sobre parámetros conductuales fue clave para determinar la eficacia terapéutica de las mismas. Se observó que la administración IC de las 2 dosis más elevadas del vector AAV9-*Naglu* en ratones MPSIIIB dio lugar a la completa recuperación de la actividad locomotora y de la ansiedad. Por el contrario, los ratones MPSIIIB administrados con las 2 dosis más bajas no mostraron ninguna mejoría en ninguno de los parámetros analizados. Además, el tratamiento con las 4 dosis de estudio dio lugar a un aumento significativo de la esperanza de vida del modelo animal.

Por tanto, el conjunto de los resultados obtenidos tras el análisis del estudio de dosis-respuesta demostró efecto terapéutico con todas las dosis del vector administradas en la mayoría de los parámetros analizados. Sin embargo, las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg fueron las únicas capaces de revertir las alteraciones conductuales y, además, de aumentar significativamente la esperanza de vida del ratón MPSIIIB, dos aspectos clave para evaluar la eficacia de cualquier terapia génica debido a su impacto clínico. Por ello, se designó la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg como la “dosis mínima terapéutica”, dosis tres veces más baja que la administrada en el estudio anterior (Ribera, 2015). El empleo de dosis más bajas es muy importante desde el punto de vista traslacional, ya que reduce una posible toxicidad debida a la administración del vector terapéutico. Además, es también crucial a nivel de la producción a gran escala de los vectores AAV terapéuticos, pues permite reducir el coste.

El ratón MPSIIIB, así como los pacientes humanos, presenta una progresiva pérdida auditiva y visual con la evolución de la enfermedad. Debido a que éstas son alteraciones muy discapacitantes en los pacientes, el segundo objetivo de esta tesis se basó en determinar el posible efecto terapéutico de la administración IC del vector AAV9-*Naglu* a la “mínima dosis terapéutica” sobre estas afectaciones neurosensoriales del ratón MPSIIIB.

En primer lugar, y previo a la evaluación de la eficacia terapéutica del tratamiento sobre la patología auditiva del ratón MPSIIIB, se estudió la biodistribución de los vectores AAV9 en la cóclea tras su administración vía cisterna magna. Para ello, se administró el vector AAV9-GFP directamente al LCR de ratones sanos, a las dosis de  $9.3 \times 10^9$  y de  $2.0 \times 10^{10}$  vg, pues fueron las dosis que demostraron una mayor eficacia terapéutica en el estudio de dosis-respuesta. Se observaron niveles de expresión *GFP* en ambos grupos administrados, aunque dichos niveles de expresión génica fueron más elevados en el grupo de ratones administrados con la dosis más alta.



A nivel histológico, en los ratones administrados con ambas dosis del vector AAV9-GFP se apreciaron las mismas estructuras de la cóclea transducidas, entre las que se encontraban la parte basal del ligamento espiral (SLg), el limbo espiral (SL) y las células ciliadas externas (OHCs). El SL es una extensión del modíolo, por lo que está compuesta de periostio. Esto indica que el vector AAV9 es capaz de transducir el tejido conjuntivo adherido a la parte externa del hueso de la cóclea. Otra región donde se observa una intensa marca positiva contra GFP es la parte basal del SLg que conecta con el órgano de Corti. Esta región se denomina sulco externo y en ella residen diferentes células de soporte. Entre éstas se encuentran las células raíz (*root cells*), que llaman particularmente la atención por su morfología. El soma de estas células reside en el sulco externo, pero sus protuberancias se internan hacia el SLg, conectado, de alguna manera, el epitelio sensorial del órgano de Corti con el SLg (*Jagger, 2012*). Las inmunohistoquímicas con señal positiva para GFP en la base del SLg no revelan la presencia de núcleos celulares a su alrededor, por lo que esta marca podría corresponderse con las protuberancias de las células raíz que se internan en el SLg. Cabe destacar la importancia de la capacidad del vector AAV9 para transducir las OHCs, ya que es un tipo celular que se pierde en los ratones MPSIIIB y, además, es clave para la función auditiva. Sin embargo, se observó que la transducción de la cóclea por parte del vector AAV9-GFP no era amplia, sino que era muy irregular, pues el % de transducción de este órgano variaba entre los animales administrados con ambas dosis. Ello sugiere que, tras la administración IC, hay una baja proporción de partículas del vector AAV9 que son capaces de transducir las distintas estructuras de la cóclea.

Estas estructuras cocleares transducidas por el vector AAV9 están en contacto directo con la perilinfa, por lo que, la administración del vector AAV9-*Naglu* en ratones MPSIIIB permitiría la transducción de estas mismas células, que podrían producir proteína NAGLU y secretarla a la perilinfa, permitiendo así su distribución a través de este fluido y haciéndola accesible a otros tipos celulares no transducidos por el vector.

Debido a que las estructuras cocleares transducidas con ambas dosis del vector AAV9-GFP fueron las mismas, se decidió llevar a cabo el estudio de eficacia terapéutica en la cóclea de ratones MPSIIIB con el vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg/ratón, la “dosis mínima terapéutica”.

A nivel auditivo, el modelo murino de la MPSIIIB presenta alteraciones cocleares evidentes que conllevan a la pérdida de audición a partir de los 6 meses de edad (*Heldermon, 2007*). Por ello, se quiso evaluar el efecto de la terapia con AAV9-*Naglu* sobre la función auditiva. El análisis se realizó en ratones de 6 meses de edad, pues el

estudio no se pudo llevar a cabo a más largo plazo ya que es a esta edad cuando los ratones sanos de la cepa empleada (C57Bl/6) empiezan a mostrar signos claros de presbiacusia (pérdida de audición) (Henry, 1980; Hequembourg, 2001b; Mikaelian, 1979; Wang, 2008; Willott, 1986).

En primer lugar, se comprobó si, transcurridos 4 meses desde la administración IC con el vector AAV9-*Naglu*, se detectaban niveles cuantificables de actividad NAGLU en la cóclea de los ratones MPSIIIB tratados. Se observó una normalización de la actividad NAGLU en la cóclea, indicando que se mantenía la actividad NAGLU a niveles indistinguibles con los ratones sanos. Esto provocó una normalización del contenido de GAGs en la cóclea de los ratones tratados. Sin embargo, a nivel histológico, se observó una preservación parcial de la citoarquitectura coclear tras el tratamiento de ratones MPSIIIB con el vector AAV9-*Naglu*. Por tanto, no se conservaba el 100% de la morfología normal de la cóclea en los ratones MPSIIIB tratados. Esta conservación, aunque parcial, fue particularmente notoria y relevante en el epitelio sensorial del órgano de Corti, pues éste es el responsable de la conversión de las ondas sonoras en estímulos nerviosos que se transmitirán al córtex cerebral para que se origine la audición (Hunter, 2020). Sin embargo, al realizar la prueba funcional del ABR para medir la audición de los ratones MPSIIIB tratados, se observó que la administración IC del vector AAV9-*Naglu* permitía la preservación de la función auditiva en el 50% de los ratones.

En conjunto, estas observaciones podrían sugerir que los ratones cuya preservación de la citoarquitectura coclear era mayor podría corresponderse con el 50% de animales tratados que presentaban conservación de la función auditiva, mientras que los ratones que presentaron hipoacusia (el otro 50% de los animales tratados), podría deberse a una menor preservación de la morfología de la cóclea.

Esta preservación de la función auditiva sólo en un subgrupo de ratones MPSIIIB tratados ya había sido descrita en un estudio previo (Lofti, 2018). En dicho estudio, los autores también observaron 2 subgrupos dentro del grupo de ratones MPSIIIB tratados. Tras la administración oral de trehalosa (un activador del flujo autofágico) a ratones MPSIIIB, se observó que un subgrupo de animales conservaba la capacidad auditiva a los 6 meses de edad, mientras que otro subgrupo de ratones MPSIIIB tratados no mostraron preservación de la audición (Lofti, 2018). Esto estaría de acuerdo con lo observado en nuestro estudio, pues aun presentando niveles de actividad NAGLU en la cóclea indistinguibles a los de ratones sanos y corrigiendo el acúmulo anómalo de GAGs en este órgano, no se conserva la función auditiva en el 100% de los ratones tratados.

Dado que el estudio de biodistribución con el vector AAV9-GFP demostró una mayor expresión de este gen a la dosis de  $2.0 \times 10^{10}$  vg/ratón, se esperaría que, muy probablemente, la administración del vector AAV9-*Naglu* a esta dosis provocara una mayor transducción de las estructuras cocleares, preservando en mayor medida la citoarquitectura de la cóclea y, por consiguiente, originando una conservación de la audición en mayor medida o en su totalidad en el grupo de ratones tratados.

Además, es importante recalcar que existe una conexión entre el LCR y la perilinfa que baña las cámaras superior e inferior de la cóclea. Esta conexión se da a través del acueducto coclear, que drena directamente sobre la ventana redonda (*Feijen, 2004; Salt, 2015*). Esto es importante porque, tras la administración de los vectores AAV9 al LCR, éstos pueden llegar hasta la cóclea a través de la perilinfa. No obstante, tras la administración IC de los vectores AAV9, éstos son mayoritariamente captados por el SNC, por lo que la proporción de vectores disponibles que pudieran llegar a la cóclea a través del acueducto coclear a la perilinfa podría ser crucial para que se diera una transducción en mayor o menor medida de ésta. Lo cual conllevaría, a su vez, a una mayor o menor conservación de la función auditiva en los ratones MPSIIIB tratados con el vector AAV9-*Naglu*. Existen estudios que demuestran la transducción con vectores AAV de las células ciliadas (HCs) y de las células de soporte (SCs) de la cóclea. Pero en ellos, la administración es directamente a la perilinfa a través de la ventana redonda (*Fangzhi, 2019*). Por el contrario, nuestra aproximación de terapia génica se basa en una única administración al LCR vía cisterna magna, por lo que la conexión existente entre el LCR y la perilinfa es lo que sustentaría la posibilidad de transducción coclear por parte del AAV9 administrado. Otra opción que no se puede descartar es que la NAGLU secretada por las neuronas del cerebro al LCR llegue a las estructuras cocleares a través de la misma ruta LCR-perilinfa. Además, el LCR también baña el nervio vestibulococlear, cuya rama coclear está compuesta por los axones de las neuronas bipolares del ganglio espiral que hacen sinapsis con las HCs del órgano de Corti. Por tanto, las partículas del vector AAV9 así como también la enzima NAGLU secretada al LCR podrían ser accesibles al epitelio sensorial del órgano de Corti dando lugar a la preservación de éste.

Para comprobar exactamente la ruta a través de la cuál llega el vector AAV9 administrado IC directamente al LCR son necesarios estudios que permitan analizar en profundidad cómo se da dicha transducción coclear.

Además de las alteraciones auditivas, el ratón MPSIIIB también presenta alteraciones visuales, aunque a edades más avanzadas. Se inician con una pérdida de

fotorreceptores a los 7 meses de edad y, al año, ya se observa una pérdida de alrededor del 50% de estos fotorreceptores y de las células bipolares (Tse, 2015). Por ello, se estudió el efecto a largo plazo del tratamiento con el vector AAV9-Naglu sobre la función visual. Tras 10 meses de tratamiento con el vector AAV9-Naglu, se observó un incremento de los niveles de actividad NAGLU en la retina, el nervio óptico y el humor acuoso de los ratones MPSIIIB tratados. A pesar de que estos aumentos se correspondían con el 10% de la actividad NAGLU de ratones sanos en la retina y, aproximadamente, el 50% respecto a animales WT en el nervio óptico y el humor acuoso, esto se tradujo en la normalización del contenido de GAGs a largo plazo en la retina de los ratones tratados. La corrección del acúmulo patológico de GAGs en la retina se corroboró con el análisis de la distensión lisosomal en ésta, pues la marca positiva contra LIMP2 se redujo hasta niveles indistinguibles con los de ratones WT. Esto confirmaría la existencia de un “umbral clínico” de actividad enzimática a partir del cual se da corrección de la patología lisosomal. Además, no se puede descartar que la actividad NAGLU del nervio óptico y el humor acuoso contribuyeran a la corrección del acúmulo lisosomal de GAGs en la retina. No obstante, tampoco se debe obviar la posibilidad de que la enzima NAGLU circulante contribuya a la normalización del contenido de GAGs en la retina (Puzzo, 2017), pues se podría dar una transcitosis de la enzima desde el torrente sanguíneo que cruzara la BHR y llegara a la retina, permitiendo la corrección de la patología lisosomal en ésta (Ruzo, 2012).

Se ha descrito gliosis retiniana en el modelo murino de la MPSIIIB (Tse, 2015) que, al igual que en el resto del SNC, está asociada con la inflamación. Por este motivo se estudió el efecto del tratamiento sobre la gliosis de la retina. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones MPSIIIB de 12 meses de edad presentaban elevados niveles de astrocitosis y microgliosis en la retina en comparación con los animales sanos de la misma edad. Sin embargo, los ratones tratados IC con el vector terapéutico mostraban una reducción parcial en los niveles de gliosis, lo cual estaba de acuerdo con lo observado previamente en el estudio de dosis-respuesta, donde la gliosis del SNC sólo se veía parcialmente reducida en presencia de bajos niveles de actividad NAGLU a pesar de que hubiera una completa corrección de la patología lisosomal.

Asimismo, en el modelo murino de la MPSIIIB también se ha descrito neurodegeneración de los fotorreceptores de la retina (Heldermon, 2007; Tse, 2015). La neurodegeneración de la retina es un proceso irreversible, por lo que, para prevenirla, se deben tratar animales previamente a la aparición de la degeneración de los fotorreceptores. Tras 10 meses de tratamiento con el vector AAV9-Naglu, y de manera inesperada, no se observó ningún cambio en el grosor de la INL (capa nuclea interna)

de la retina de los distintos grupos experimentales, lo que sugería que no había pérdida de las neuronas de esta capa en ratones MPSIIIB, como sugieren otros autores (Tse, 2015; Lofti, 2018). Esta discordancia entre los resultados de nuestro estudio y los publicados por otros autores se podrían deber a las distintas condiciones experimentales (condiciones de estabulación, etc.). En cambio, en la ONL (capa nuclear externa), se observó una clara disminución en el grosor de esta capa en los ratones MPSIIIB en comparación con los animales sanos, indicativo de una pérdida de las neuronas residentes en esta capa, los fotorreceptores. No obstante, los animales tratados con el vector AAV9-*Naglu* mostraban una conservación parcial del grosor de esta capa, lo que denotaba una preservación parcial de fotorreceptores tras 10 meses de tratamiento. Los ratones MPSIIIB tratados con el vector terapéutico mostraron una conservación total de conos, mientras que la preservación de bastones en dichos animales era parcial. Esto se confirmó con el análisis de la respuesta eléctrica de la retina, mediante un electroretinograma (ERG). Esta prueba puso de manifiesto que, en los ratones MPSIIIB tratados con el vector terapéutico, la respuesta dependiente de los conos se conservaba en su totalidad a largo plazo, mientras que la respuesta dependiente de los bastones se preservaba de manera parcial.

Para estudiar el efecto de la pérdida de bastones sobre la agudeza visual, se sometieron a los ratones a los tests de *Optomotor Response* (OR) y *Visual Water Task* (VWT). Ambos tests miden agudeza visual, pero el VWT, además, también evalúa el nivel de aprendizaje. De manera general, se observó una conservación de la agudeza visual de los ratones tratados con el vector terapéutico a largo plazo. Particularmente, en el caso del OR, se observó que la conservación de la agudeza visual de los ratones tratados era parcial, lo que concuerda con otros estudios que ponen de manifiesto que la preservación de dicha agudeza visual sucede en ratones con conservación total de los conos y parcial de bastones (Schmucker, 2005; Umino, 2008). Por otro lado, el VWT demostró que existía una mejora más significativa a largo plazo de esta agudeza visual en los ratones tratados y que éstos también presentaban un mayor nivel de aprendizaje que los ratones MPSIIIB no tratados.

Por tanto, se puso de manifiesto que, a pesar de no alcanzar niveles de actividad NAGLU en la retina de los ratones tratados equiparables a los de animales sanos, se conseguía preservar de manera parcial los fotorreceptores. Esto repercutía en una mejora significativa de la respuesta eléctrica de la retina y conllevaba a la preservación de la agudeza visual a largo plazo.

Puesto que la presencia de la barrera hematorretiniana (BHR), análoga a la barrera hematoencefálica (BHE), dificulta el paso de grandes moléculas desde la circulación hasta la retina, una de las posibilidades para que se transduzca ésta por parte de los vectores AAV9 es que, los pocos vectores que queden en circulación tras la captación de éstos por el hígado, éstos circulen hasta ella a través del torrente sanguíneo. Esto sería posible gracias a la vascularización presente en distintas capas de la retina. Existen dos plexos vasculares en la retina y se encuentran en la INL y la GCL (capa de células ganglionares), por lo que los vasos sanguíneos presentes en dichas capas podrían permitir la llegada del vector viral hasta las células horizontales. Además, la baja proporción de estas células en la retina, junto con la poca cantidad de vector que llegaría, concordarían con los bajos niveles de expresión *GFP* detectados en la retina. De la misma manera, esto explicaría los bajos niveles de actividad NAGLU observados en la retina de los ratones tratados con el vector AAV9-*Naglu* transcurridos 10 meses desde su administración IC. No obstante, estos bajos niveles también podrían explicarse porque la NAGLU producida por las células transducidas del SNC la abocaran al LCR y ésta, de alguna manera, fuera capaz de difundir desde este fluido que baña el nervio óptico hasta la retina (Puzzo, 2017; Haurigot, 2013). Sin embargo, existe la posibilidad de que la NAGLU hepática circulante por el torrente sanguíneo llegara a la retina por la vascularización de la RPE.

No obstante, cabe destacar la conexión existente entre la retina y el humor acuoso (Haurigot, 2009), por lo que los niveles de actividad NAGLU observados en este último podrían deberse a la contribución de la enzima NAGLU producida por la retina, que está en contacto con los procesos ciliares y que éstos la captaran y la secretaran al el humor acuoso. Al igual que en la transducción coclear, para determinar con claridad cuál es la ruta a través de la que llegan los vectores virales a la retina tras su administración IC, se requieren estudios que evalúen las distintas vías más en profundidad.

De manera similar a lo que se postuló para la función auditiva, en la función visual también se sugiere que la administración de una dosis más elevada del vector AAV9-*Naglu*, como la de  $2.0 \times 10^{10}$  vg, conllevaría la conservación total de la visión a largo plazo en los ratones tratados.

En resumen, se puede concluir que una única administración IC al LCR del vector AAV9-*Naglu* a la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg, es capaz de prevenir la pérdida neurosensorial de los ratones MPSIIIB. Por un lado, la estrategia terapéutica utilizada permite evitar la pérdida de la función auditiva tras 4 meses de tratamiento y preservar a más largo plazo (12 meses de edad) la función visual de este modelo animal. Por tanto, se demostró la

eficacia terapéutica de la administración IC al LCR del vector AAV9-*Naglu* a la dosis mínima terapéutica en la corrección de las afectaciones neurosensoriales que alteran las funciones auditiva y visual del modelo murino de la MPSIIIB. A falta de evaluar el efecto de esta terapia en animales de mayor tamaño, este estudio abre la puerta a la posibilidad de probar dicho tratamiento en pacientes de la MPSIIIB con la finalidad de corregir, no sólo las principales alteraciones del SNC y conductuales derivadas de la enfermedad, sino también las afectaciones auditivas y visuales que se presentan en el transcurso de la MPSIIIB.

## ***VI. Conclusiones***



1. El tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* a las dosis de  $2.0 \times 10^9$ ,  $4.3 \times 10^9$ ,  $9.3 \times 10^9$  y  $2.0 \times 10^{10}$  vg/ratón en ratones MPSIIIB aumentó los niveles de actividad NAGLU de manera dosis-dependiente a nivel del SNC y periférico, llevando a la normalización del contenido de GAGs en todas las regiones del encéfalo y en la mayoría de tejidos periféricos analizados.
2. El tratamiento con las dosis estudiadas del vector *AAV9-Naglu* redujo la neuroinflamación de manera dosis-dependiente en los ratones MPSIIIB tras 4 meses de tratamiento.
3. El tratamiento de los ratones MPSIIIB con el vector *AAV9-Naglu* reducía los niveles de ansiedad y aumentaba la actividad locomotora y la esperanza de vida de los ratones tratados, siendo la corrección de dichos parámetros mayor con la administración de las dosis más altas. Esto permitió designar la dosis de  $9.3 \times 10^9$  vg como la “dosis mínima terapéutica”.
4. Los ratones tratados con  $9.3 \times 10^9$  vg del vector *AAV9-Naglu* mostraron una recuperación de los niveles de actividad NAGLU en la cóclea equiparables a los de animales sanos y la corrección de la acumulación anómala de GAGs en este tejido.
5. El tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* permitió la preservación parcial de la citoarquitectura coclear en los ratones MPSIIIB tratados y que el 50% de éstos conservara la función auditiva.
6. El tratamiento a largo plazo de los ratones MPSIIIB con el vector *AAV9-Naglu* mostró un incremento de los niveles de actividad NAGLU en el ojo y la normalización del contenido de GAGs en la retina.
7. El tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* previno la neurodegeneración de la retina a largo plazo, conservando la totalidad de los conos y parcialmente los bastones.

8. El tratamiento con el vector *AAV9-Naglu* permitió la conservación de la agudeza visual a largo plazo en los ratones MPSIIIB tratados gracias a la preservación parcial de los fotorreceptores.
  
9. En resumen, los resultados observados en este trabajo proporcionan una base sólida para la traslacionalidad de una estrategia de terapia génica mediada por vectores *AAV9-Naglu* para el tratamiento de las alteraciones de la MPSIIIB.



## ***VII. Materiales y Métodos***



## 1. MATERIALES

### 1.1. Animales

Los animales empleados en el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron ratones *knockout* (KO) para el gen *Naglu* adquiridos en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Main, EE. UU.), pertenecientes a la cepa B6.129S6-*Naglu*<sup>tm1Efn</sup>/J. Tal cual se describió en su momento por los creadores de este modelo animal, este KO se generó a partir de la inducción de la mutagénesis en el gen *Naglu*, donde se disrumpió el exón 6 gracias a la introducción del gen de resistencia a la neomicina (Li, 1999).

Gracias a la presencia de instalaciones libres de patógenos específicos (SPF: *Specific Patogen Free*) en nuestro centro (SER-CBATG), los animales pudieron ser estabulados bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminación (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, encendiendo éstas a las 8 de la mañana). Además, los animales han podido disponer de agua y alimento *ad libitum* (dieta estándar 2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EE. UU).

En dichas instalaciones, se pudo establecer la colonia KO para el gen *Naglu* mediante el retrocruzamiento de ratones heterocigotos para esta mutación.

Para este estudio, se han empleado ratones macho sanos y KO para evaluar el efecto terapéutico de la administración intracisterna (IC) del vector viral AAV9-*Naglu* a diferentes dosis sobre la patología neurológica y periférica, su eficacia sobre las afectaciones auditiva y visual y la biodistribución de los vectores AAV9 en la cóclea y el ojo de este modelo animal.

Tanto los procedimientos experimentales como el bienestar animal fueron previamente evaluados, aprobados y autorizados por el Comité de Ética en la Experimentación Animal y Humana de la UAB.

### 1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos enumerados en la **Tabla 4** y en la **Tabla 5** se emplearon en la realización de las inmunohistoquímicas y *Western blots*, respectivamente.

**Tabla 4. Lista de anticuerpos empleados en las inmunohistoquímicas**

<b>Inmunohistoquímica</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b>Huésped</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b><i>Anticuerpos primarios</i></b>				
Anti-GFAP	Conejo	Dako	E0467	1/1000
BSI-b4 (Isolectina)	-	Merck	L5391	1/100
Anti-LIMP2	Conejo	Novus Biologicals	NB400-129	1/100
Anti-PKC $\alpha$	Ratón	Sigma	P5704	1/100
Anti-cone arrestin	Conejo	Merck	AB15282	1/1000
Anti-GFP	Cabra	Abcam	ab6673	1/300
<b><i>Anticuerpos secundarios</i></b>				
Anti-Rabbit IgG biotinilated	Cabra	Thermo Fisher Scientific	31820	1/300
Anti-Mouse IgG biotinilated	Caballo	Vector Labs	BA-2000	1/300
Anti-Rat IgG biotinilated	Conejo	Dako	E0467	1/300

**Tabla 5. Listado de anticuerpos utilizados en los *Western blot*.**

<b><i>Western blot</i></b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b>Huésped</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b><i>Anticuerpos primarios</i></b>				
Anti-cone arrestin	Conejo	Merck	AB15282	1/1000
Anti-rhodopsin	Conejo	Abcam	ab3424	1/1000
<b><i>Anticuerpos secundarios</i></b>				
Anti-Rabbit IgG HRP	Cerdo	Dako	P0217	1/20.000

## **1.1. Reactivos**

Todos los reactivos de biología molecular utilizados para el desarrollo de la presente tesis doctoral se obtuvieron a partir de los fabricantes comerciales siguientes: Abcam (Cambridge, Reino Unido), DakoCytomation (Glostrup, Dinamarca), Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Panreac (Barcelona, España), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), Qiagen (Hilden, Alemania), New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU), Roche (Roche Diagnostics Corp, IN, EEUU), Fermentas (St. Leon-Rot, Alemania), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU), Stratagene-Agilent technologies, (Santa Clara, CA, EEUU), Merck (Darmstadt, Alemania), Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU), Lucigen (Middleton, WI, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá), Vector Laboratories Ltd. (Reino Unido), Laboratorios del Dr. Esteve (Barcelona, España), Electron Microscopy Science (Hatfield, PA, EEUU), Millipore (Burlington MA, EEUU).

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Técnicas de obtención y manipulación del RNA**

#### ***2.1.1. Aislamiento y purificación de RNA total***

El aislamiento del RNA total se llevó a cabo mediante la homogenización de muestras congeladas en *TriPure Isolation Reagent (Roche)* con un politrón. La extracción de RNA se basa en una extracción de fenol-cloroformo de tejidos homogenizados utilizando la tiocianat guanidina como inhibidor de la ribonucleasa. La fracción correspondiente al RNA total se extrajo mediante la adición de 200  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de *TriPure* y, seguidamente, se emplearon columnas de adsorción (*RNeasy Mini Kit, Quiagen*) para la purificación del RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se trataron con DNasa I directamente en la columna con el *kit* comercial *RNase-Free DNase Set (Quiagen)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras realizar dos lavados en la columna con el tapón correspondiente, se eluyó el RNA total mediante la adición de 30-50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Mili-Q. Finalmente, la concentración y la calidad de las muestras de RNA se determinó mediante la medida de la absorbancia en el rango ultravioleta con el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 (Termo Fisher Scientific)*.



### 2.1.2. Síntesis del cDNA

Se retrotranscribió 1 µg de RNA total a cDNA utilizando el *kit* comercial *Transcriptor First Strand sCNA Synthesis (Roche)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon oligonucleótidos Oligo-dT y hexámeros aleatorios para la amplificación del cDNA en presencia de *Protector RNase Inhibitor*, presente en el *kit* comercial (*Roche*).

### 2.1.3. Cuantificación de la expresión del mRNA por Real-Time qPCR

Tras la retrotranscripción, el cDNA de las muestras se diluyó 1/10 para poder llevar a cabo la Real-Time qPCR. Ésta se realizó con los *kits* comerciales *Light Cycler® 480 SybrGreen I Master (Roche)*, siguiendo las instrucciones del fabricante (**Tabla 6**). Los oligonucleótidos empleados se indican en la **Tabla 7**.

**Tabla 6. Componentes de la qPCR mediante TaqMan.**

Reactivo	Volúmenes para 1 reacción (µL)
LightCycler® 480 Probe Master 2x	5
Primer Forward (10 mM)	0.2
Primer Reverse (10 mM)	0.2
sonda (10µM)	0.1
Agua Mili-Q	2.5
cDNA	2
<b>Volúmen total</b>	<b>10</b>

**Tabla 7. Lista de oligonucleótidos utilizados en la qPCR.**

Gen	Seqüências (5'→3')
WPRE	<b>Forward</b> CGGCTGTTGGGCACTGA
	<b>Reverse</b> GGAAGGTCGCTGGATTGA
	<b>Sonda</b> 6FAM-ATGGCTGCTZENCGCCTGTGTTGCC-IBFQ
Rplp0	<b>Forward</b> ACTGGTCTAGGACCCGAGAGG
	<b>Reverse</b> TCCCACCTTGCTCCAGTCT
	<b>Sonda</b> 6FAM-CCCTGATCGGCAACCTGTTCCCT-IBFQ

## 2.2. Transfección de cultivos celulares HEK-293 con DNA plasmídico

Para la transfección *in vitro* de cultivos celulares HEK- 293 con DNA plasmídico, se siguió el protocolo comercial *Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)*, basado en la transfección del DNA con liposomas catiónicos. Brevemente, cultivos adherentes de células HEK-293 en placas de 6 pocillos (*Thermo Fisher Scientific*) se transfectaron con 4 µg de DNA plasmídico incluido en el interior de los liposomas catiónicos formados por la Lipofectamina, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 48 h de incubación, se recogieron el medio de cultivo y las células por separado (éstas últimas en 1 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

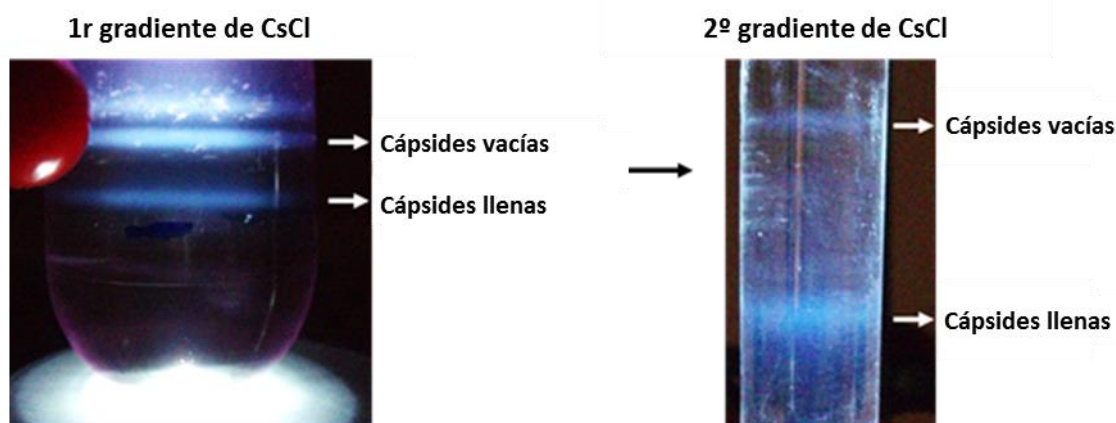
## 2.3. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados

### 2.3.1. Producción y purificación

Las partículas infectivas de vectores virales AAV9 se generaron en cultivos celulares HEK-293 cultivados en *Roller Bottles (RB) (Greiner Bio-One)* mediante el protocolo de triple transfección (*Ayuso, 2010*) que implica la utilización de 3 plásmidos (**Figura 10**). Este protocolo basado en la precipitación de los virus mediante PEG y la ultracentrifugación con gradientes de CsCl permite eliminar prácticamente el contenido de cápsides vacías y disminuir las impurezas proteicas, aumentando de esta manera la pureza de la preparación viral, lo cual resulta en niveles más elevados de transducción *in vivo* (*Ayuso, 2010*).

Las células HEK-293 se cultivaron hasta alcanzar la confluencia de, aproximadamente, el 80% en el medio DMEM suplementado con un 10% de FSB + 1% de Penicilina/estreptomicina. La cotransfección de cada RB se llevó a cabo en 15 mL de PEI MAX (*Polysciences*) – DNA (en una proporción 2:1 p/p) en DMEM + 1% de Penicilina/estreptomicina. La mezcla de DNA consiste en 20 µg del plásmido de interés (con el constructo de expresión flanqueado por las ITRs), junto con 100 µg del plásmido accesorio pRep2Cap9 (plásmido de expresión codificante para las proteínas de la cápside proteica de las partículas proteicas y para las proteínas necesarias para la replicación viral) y 100 µg del plásmido pAdHelper (plásmido de expresión codificante para las proteínas adenovirales auxiliares necesarias) (**Figura 10**). El plásmido pRep2Cap9 fue cedido por la Dra. Katherine High del *Children's Hospital of Philadelphia*.

Transcurridas 72 h desde la transfección, se recogieron y centrifugaron las células a 2.500 g durante 15 min a 4°C. El medio de cultivo se almacenó a 4°C. El *pellet* celular se reconstituyó en tampón TMS (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) y se sonicó para lisar las células y obtener las partículas víricas de su interior. Este lisado se centrifugó a 2.500 g durante 30 min y el sobrenadante de dicha centrifugación se añadió al medio de cultivo previamente almacenado a 4°C. A continuación, las partículas virales se precipitaron mediante una incubación de 15 h en PEG 8.000 al 8% (*Sigma*) a 4°C. Transcurrido este período, los vectores se precipitaron por centrifugación a 4.000 g durante 30 min. Este nuevo *pellet*, que contenía los vectores virales tanto del medio de cultivo como de las células, se recogió con TMS, tratados con benzonasa (*Merck*) durante 1 h a 37°C y, finalmente, centrifugado a 1.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se cargó en tubos de 37.5 mL *Ultra clear* (*Beckman*) que contenían en gradiente discontinuo de CsCl de densidad 1.5g/mL (5 mL) y 1.3 g/mL (10 mL). A continuación, se centrifugaron durante 17 h a 27.000 rpm en un rotor SW28 (*Beckman*). Las bandas de virus (**Figura 43**) fueron recogidas mediante agujas de 18G y se transfirieron a tubos *Ultra clear* de 12.5 mL. El resto del volumen del tubo se rellenó con CsCl a 1.379 g/mL con el fin de generar un gradiente continuo. Estos tubos se centrifugaron a 38.000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durante 48 h (**Figura 43**). Finalmente, se recogieron y dializaron ls bandas correspondientes a las partículas virales llenas en PBS + 0.001% Plurónico F68 mediante una membrana de 10 kDa (*Thermo Fisher Scientific*) y, posteriormente, se filtraron mediante filtros de 0.22 µm (*Millipore*).



**Figura 43. Purificación de los vectores AAV.** El primer gradiente de CsCl permite separar los vectores que contienen el transgén (cápsides llenas), de la mayor parte de impurezas y cápsides vacías. El segundo gradiente de CsCl permite separar las cápsides llenas, de impurezas de densidad similar, como por ejemplo las especies intermedias. *Adaptado de Ayuso, 2010.*

### 2.3.2. Titulación de genomas virales

La titulación de genomas virales de los diferentes lotes de vectores AAV generados se realizó mediante el método *PicoGreen* (*Thermo Fisher Scientific*). Para comprobar la validez de los resultados, se cuantificó, paralelamente, un vector de referencia de titulación conocida. El *PicoGreen* es un fluorocromo de alta sensibilidad que se une al DNA de doble cadena, siendo muy robusto a la contaminación por proteínas, DNA de cadena sencilla o RNA. Primero, se lisaron las cápsides para liberar el DNA de cadena simple positiva y negativa encapsidado, de tal manera que pudieran hibridar y generar el DNA de cadena doble. Se empleó DNA de concentración conocida (fago lambda) suministrado por el fabricante para generar una curva de calibración.

Para asegurar la no sobreestimación del título de los vectores a causa de contaminación con DNA restante del proceso de producción y purificación, se procesaron en paralelo los vectores sin lisar. De esta manera se pudo cuantificar el DNA no encapsidado y se restó al título obtenido del vector lisado.

Para lisar las muestras, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de cada preparación del vector viral a 8  $\mu\text{L}$  de PBS + 0.001% Plurónico F68 y 10  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl y 0.2% SDS, pH 7.4). Posteriormente, se incubaron durante 1 h a 70°C. Paralelamente, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de las muestras no lisadas a cada preparación del vector viral a 8  $\mu\text{L}$  de PBS + 0.001% Plurónico F68 y 10  $\mu\text{L}$  de tampón TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 180  $\mu\text{L}$  de tampón TE a los 20  $\mu\text{L}$  de las muestras lisadas y no lisadas.

Se hizo una dilución seriada del DNA de referencia con el tampón TE para generar la curva de calibración.

En una placa negra de 96 pocillos, se añadieron 180  $\mu\text{L}$  de *PicoGreen* a una concentración 1X en tampón TE. Seguidamente, se añadió, por triplicado, 20  $\mu\text{L}$  del DNA de referencia, de las muestras lisadas, de las no lisadas y de los blancos (tampón TE). Se excitó el fluorocromo a 485 nm y la fluorescencia emitida se midió a 535 nm en el fluorímetro Synergy HTX (*BioTek Instruments*). El valor de fluorescencia de los blancos (ruido de fondo) se restó al valor obtenido en el resto de pocillos. Además, el valor de fluorescencia de las muestras no lisadas se restó a las muestras lisadas (donde el genoma viral se encuentra en forma de doble cadena). El título de las diferentes producciones del vector (**Tabla 8**) se obtuvo por interpolación de la fluorescencia obtenida en la regresión lineal de la fluorescencia de la curva de calibración.

**Tabla 8. Cuantificación de genomas virales**

<b>Vector viral</b>	<b>Título (vg/ml)</b>
AAV9-CAG-GFP-WPRE	4.4 x 10 <sup>13</sup>
AAV9-CAG-mNaglu	1.6 x 10 <sup>13</sup>

### **2.3.3. Cuantificación de partículas virales**

El análisis por electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE y la tinción con *Sypro Ruby* permite determinar la cantidad de cápsides producidas. Este valor, junto con el número de genomas virales, permite conocer el % de cápsides vacías (genomas virales/número de cápsides). Por otro lado, este método también permite visualizar el grado de contaminación con otras proteínas no virales, hecho que puede alterar la capacidad infectiva *in vivo*. El volumen apropiado del vector de interés y diferentes diluciones de un vector de referencia de concentración conocida se mezclaron con Laemmli 4X a un volumen final de 20 µL. Tras su incubación a 95 °C durante 5 min, as muestras se cargaron a un gel de acrilamida Bis-Tris de 15 mm y de 15 pocillos (*Thermo Fisher Scientific*) y se corrieron a 120 V durante 2 h y 30 min. Las proteínas se fijaron con metanol-acético. Posteriormente, se incubó el gel en 100 mL de *Sypro Ruby Protein Gen Staining* (*Thermo Fisher Scientific*) hasta la mañana siguiente. Se realizaron 2 lavados del gel, primero con metanol-acético y, luego, con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Finalmente, se midió la fluorescencia de las proteínas en un transiluminador UV (*Syngene*). El título de las partículas virales se obtuvo por densitometría. Se generó una curva de calibración a partir de la intensidad de la proteína VP3 en cada una de las diluciones del vector de referencia, gracias a la cual se interpoló la concentración de las preparaciones de vector analizadas.

## 2.4. Administración *in vivo* de los vectores AAV

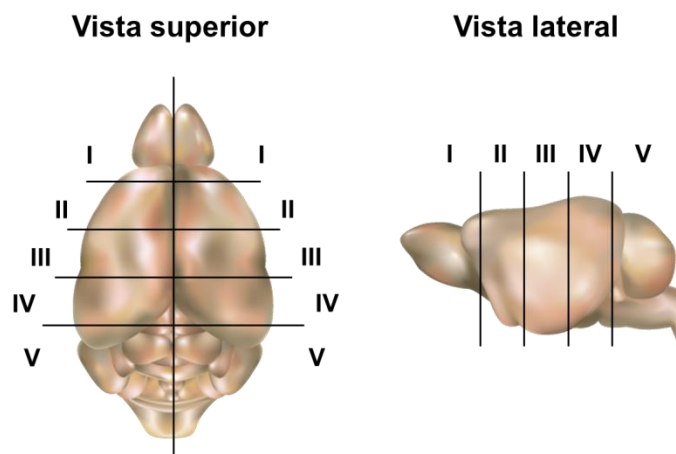
### 2.4.1. Administración intracisterna magna de los vectores AAV9 a ratones

La administración intracisterna magna de los vectores virales AAV9 en ratones se llevó a cabo bajo anestesia, la cual se administró mediante una inyección intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg). Una vez anestesiados, se rasuró el pelo de la parte posterior de la cabeza de los ratones, de las orejas hasta, aproximadamente, las escápulas y se realizó una pequeña incisión de 2-3 mm en la zona correspondiente a la parte final del cráneo e inicio de la columna vertebral, coincidiendo con la línea media. Los animales se mantuvieron en posición decúbito supino, con la cabeza inclinada hacia abajo en un ángulo de, aproximadamente, 60° respecto a la horizontal. Siguiendo el mismo ángulo de inclinación, se introdujo una aguja de 34G unida a una jeringa *Hamilton (Hamilton Company)* para acceder a la cisterna magna a través del *foramen magnum*. A continuación, se administraron 5 µL del vector viral a la dosis escogida directamente al LCR a través de la cisterna magna. Tras la administración del vector viral, se retiró la aguja de la cisterna magna y la incisión de la piel fue sellada con un adhesivo tisular *Histoacryl® (B. Braun)*.

## 2.5. Eutanasia y obtención de muestras biológicas *post mortem* de ratones

En el momento de la eutanasia, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg). Seguidamente, y bajo los efectos de la anestesia, se obtuvo sangre por punción intracardiaca del ventrículo izquierdo, que se mantuvo a temperatura ambiente hasta que fue procesada. Posteriormente, los ratones se perfundieron con 12 mL de PBS a través del ventrículo izquierdo, con el fin de eliminar la sangre de los vasos sanguíneos de los distintos tejidos y así evitar su posible interferencia en las posteriores determinaciones. Tras la perfusión, se extrajeron los diferentes órganos y tejidos. En el caso del cerebro, éste se dividió en dos partes iguales de manera sagital (hemisferios derecho e izquierdo) y, a su vez, se generaron 5 secciones coronarias, siendo la región "I" la más frontal y la "V" la más caudal (**Figura 44**). Todos los fragmentos del cerebro y el resto de tejidos diseccionados se mantuvieron a -80°C hasta que se procesaron. Una parte de cada tejido (en el caso del cerebro, un hemisferio entero) también se mantuvieron inmersos en paraformaldehído al 4% O/N con la finalidad de incluirlos, posteriormente, en bloques de parafina. Las muestras de sangre se centrifugaron a 6.000 g a 8°C durante 10 min.

El suero, el sobrenadante resultante, se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.



**Figura 44.** Subdivisión del cerebro murino en diferentes partes para las posteriores determinaciones.

## **2.6. Protocolo de descalcificación de cócleas de ratón**

Las cócleas de ratón se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (*Sigma*) a 4°C durante 24 h. La fijación de las cócleas se paró mediante 3 lavados con PBS 1X de 15 min cada uno. Una vez eliminados los restos de fijador, se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disuelto en tampón fosfato (0.1M, pH 7.4) para descalcificar progresivamente los huesos mediante cambios de EDTA diarios hasta conseguir el ablandamiento del tejido óseo. Una vez descalcificados, los huesos se incluyeron en bloques de parafina y se seccionaron para los posteriores estudios histológicos.

## **2.7. Western blot**

### **2.7.1. Cuantificación del contenido proteico por el método Bradford**

El método Bradford se empleó para determinar el contenido proteico de los extractos tisulares donde se debían determinar las actividades enzimáticas. Este método se basa en el cambio de color que se produce debido a la unión del colorante

*Coomassie Brilliant Blue* con las proteínas de un tejido. Debido a ello, el colorante pasa de tener un pico de absorbancia a 495 nm a 595 nm.

Los extractos proteicos de cada tejido se generaron por medio de la homogenización de éstos gracias a su sonicación en 200-500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Mili-Q. Tras la sonicación de las muestras, éstas se centrifugaron a 10.000 g a 4°C durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. A continuación, se prepararon diluciones, por duplicado, del sobrenadante recuperado de las muestras en H<sub>2</sub>O Mili-Q, a un volumen final de 800 mL. A este volumen, se le añadieron 200 mL del reactivo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*). La curva de calibrado se preparó, también por duplicado, con 0-20  $\mu$ g de BSA. Transcurridos 5 min de incubación, se transfirieron 200  $\mu$ L, tanto de la curva de calibrado, como de las muestras diluidas, a una placa transparente de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro Synergy HTX (*Biotek Instruments*). La concentración de los extractos proteicos se calculó a partir de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado.

### **2.7.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)**

La expresión proteica se analizó por electroforesis en geles de acrilamida de dos fases en presencia de SDS. La parte superior del gel, el *stacking gel* (3.2 % p/v acrilamida/bisacrilamida, 0.125 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 2.7 % v/v TEMED, 1.3% p/v Persulfato de amonio), contiene una baja concentración de acrilamida para que las proteínas se apilen y compacten en una única banda. Debajo, el *resolving gel* (12 % w/v acrilamida/bisacrilamida, 0.375 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 0.02 % p/v persulfato de amonio, 0.01 % v/v TEMED) permite la correcta separación de las proteínas por peso molecular. Antes de cargarlas en el gel de acrilamida, las muestras proteicas (10-30  $\mu$ g) se incubaron en 0.2 volúmenes de tampón de carga Laemmli 6X (20 mM tampón fosfato pH 7, 30% v/v glicerol, 4 % w/v SDS, 2 % v/v  $\beta$ -mercaptoetanol con azul de bromofenol) a 95 °C durante 3 min. La electroforesis se realizó a 100 V durante 1.5-2 en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1 % w/v SDS). Para facilitar la identificación de las bandas, se empleó un marcador de peso molecular pre-teñido de rango amplio (*Thermo Fisher Scientific*).



### **2.7.3. Electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF**

La electrotransferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a las membranas de PVDF *Immobilon-P (Millipore)* se realizó en el tampón de transferencia (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% v/v metanol) a 4°C durante 1.5 h a 100 V. Previamente, se activaron las membranas de PVDF en metanol y se equilibraron en el tampón de transferencia. Se comprobó que se hubiese dado la correcta transferencia de las proteínas mediante la tinción con *ponceau*, un colorante que se une de forma reversible a las proteínas. Finalmente, si las membranas se debían utilizar al momento se mantenían en tampón TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl); en caso contrario, se lavaban 5 s con metanol, se dejaban secar y se almacenaban.

### **2.7.4. Incubación y revelado**

Previa incubación con los anticuerpos, las membranas se bloqueaban con *blotto* 10% (10% p/v de leche en polvo desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) a temperatura ambiente durante 1 h. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a una dilución concreta en *blotto* 5% (5% p/v de leche en polvo desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) a temperatura ambiente durante 1h o a 4°C O/N. Posteriormente, se realizaron 2 lavados rápidos y 2 lavados de 5 min con TBS-T 0.05% (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20). La incubación con el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa se realizó a temperatura ambiente durante 1 h, también diluido en *blotto* 5% y, seguidamente, se realizaron 2 lavados rápidos y otro 2 de 10 min con TBST-0.05% y un lavado final de 5 min en TBS. Seguidamente, se procedió a la inmunodetección mediante el producto comercial *immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore)*, según las especificaciones del fabricante. Finalmente, se expuso un film fotosensible en las membranas para visualizar la señal. La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría, utilizando el programa libre *ImageJ (NIH)*.

## **2.8. Determinación de la actividad enzimática**

### **2.8.1. Determinación de la actividad enzimática NAGLU**

Previo a la determinación de la actividad enzimática, se realizó la cuantificación del contenido proteico por el método *Bradford* (Apartado 2.7.1). Posteriormente, la actividad NAGLU se determinó empleando el sustrato fluorogénico comercial *4MU- $\alpha$ -N-*

*acetyl-D-glucosaminide* (MU-  $\alpha$ GlcNAc) (*Moscerdam, Substrates*, Holanda) siguiendo las indicaciones del fabricante (Marsh, 1985). A modo resumen, 30  $\mu$ g de proteína total de extractos proteicos de tejido cerebral o somático, excepto hígado (del cual se empleaban 10  $\mu$ g) o 10  $\mu$ L de suero se incubaron 3h a 37°C junto con 5 nmol de sustrato MU-  $\alpha$ GlcNAc diluido en el tampón apropiado (0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 0.1 M ácido cítrico, pH 4.7) y en un volumen final de 30  $\mu$ L. Esta incubación permite que la NAGLU catalice la hidrólisis del enlace entre la N-acetilglucosaminida y el ácido urónico terminal de las cadenas de HS. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción enzimática se paró con la adición de 200  $\mu$ L de tampón *STOP* alcalino (0.5M  $\text{NaHCO}_3$  / 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 10.7 + 0.025% de Tritón X-100), y la fluorescencia emitida se detectó en un espectrofotómetro Synergy HTX (*Biotek Instruments*), empleando un filtro de excitación 360/40 nm y un filtro de emisión 460/40 nm. La actividad enzimática NAGLU se calculó por extrapolación de la fluorescencia detectada en una recta patrón formada por diluciones seriadas de 4MU (*4-MethylUmbeliferone, Sigma*), y se normalizó por la cantidad de proteína total cargada.

## 2.9. Inmunohistoquímica de secciones tisulares en bloques de parafina

Los tejidos se mantuvieron en formol 4% durante 12-24 h, fueron incluidos en bloques de parafina y, finalmente, se hicieron cortes histológicos con un micrótopo *Leica RM2135* (*Leica Biosystems*). Las secciones tisulares se desparafinaron con 2 lavados de xilol y se rehidrataron con un gradiente de etanol al 100% y 96% y PBS. Los anticuerpos que requieren recuperación de epítomos, según indicaciones del fabricante, se trataron con tampón citrato en una olla a presión. Posteriormente, se inhibió la peroxidasa endógena con metanol al 30% en PBS y 1% de  $\text{H}_2\text{O}$  al 30% durante 30 min y se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Seguidamente, las muestras se incubaron O/N a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (Apartado X), se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y, finalmente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (Apartado X) durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con el reactivo *ABC Complex* (*Vector Laboratories*), el cual emplea el 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Las imágenes en campo claro se obtuvieron con un microscopio óptico *Eclipse 90i* (*Nikon Instruments*) y las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal *Leica SP5* (*Leica Biosystems*).

En el caso de las tinciones de hematoxilina-eosina de las cócleas, éstas se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid

bajo las condiciones experimentales y los protocolos del grupo de la Dra. Isabel Varela-Nieto.

#### **2.10. Determinación del área positiva de las inmunohistoquímicas de campo claro y fluorescencia**

Se empleó el programa *NIS Elements Advanced Research 2.20 (Nikon)* para cuantificar la señal positiva contra GFAP, BSI-B4 y LIMP2 de los análisis inmunohistoquímicos del encéfalo y la retina en 3-5 imágenes representativas (magnificación original 20X) de cada zona, manteniendo los mismos parámetros para todos los animales. El % de área con señal positiva se calculó como el área positiva (en píxeles) de cada marcaje respecto al área total de la imagen.

#### **2.11. Cuantificación de células positivas de las inmunohistoquímicas de fluorescencia**

El programa *NIS Elements Advanced Research 2.20 (Nikon)* se utilizó en la cuantificación de células positivas para la señal PKC $\alpha$ , arrestina, rodopsina y DAPI de las inmunohistoquímicas de la retina en 3-5 imágenes representativa de cada zona (magnificación original 40X), manteniéndose los ismos parámetros para todos los animales. Las retinas se dividieron en periferia y centro y se cuantificó el número de células positivas para cada marcaje en las distintas regiones.

#### **2.12. Determinación del contenido de GAGs en órganos y tejidos**

Para la cuantificación del contenido de GAGs se empleó el kit comercial *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, Reino Unido)*. Este método se basa en la unión específica del colorante *1.9-dimethylmethylene blue (DMMB)* con GAGs sulfatados, como lo es el HS. De esta manera, 50-70 mg de tejido congelado se digirieron O/N a 56°C en 800  $\mu$ L de tampón fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 8) suplementado con 1 mg/mL de proteinasa K. Transcurridos 10 min de inactivación de ésta a 90°C, los tejidos digeridos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min, tras lo cual se filtraron 500  $\mu$ L de sobrenadante (*Ultrafree MC, Millipore*) por centrifugación a 12.000 g durante 5 min. Los volúmenes pertinentes para cada tejido se añadieron a 1 mL de solución colorante y, con el fin de asegurar la unión de éste con los GAGs del filtrado, se aplicó agitación durante 30 min. Finalmente, se centrifugaron los tubos, se descartó

el sobrenadante y se resuspendió el precipitado formado con 300  $\mu$ L de Solución de disociación durante 15 min de agitación. La absorbancia de las muestras se midió a 656 nm en un espectrofotómetro Synergy HTX (*Biotek Instruments*). La cantidad de GAGs del extracto inicial se determinó por extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos a 656 nm con los valores obtenidos a partir de una recta patrón realizada con diluciones seriadas del GAG condroitín 4-sulfato proporcionado con el *kit* comercial.

### **2.13. Actímetro**

La actividad locomotora de los ratones se evaluó entre las 9 y las 14 horas. Los animales se situaron en el interior de una arena con paredes transparentes de metacrilato de 41x41x30 cm. Los ratones se colocaban en la esquina inferior izquierda, mirando hacia una de las paredes. La arena se subdividía virtualmente en 3 regiones concéntricas y equidistantes: Centro, Periferia y Borde. Una cámara digital registraba el movimiento de los ratones durante 10 min. Los diferentes parámetros del test se analizaron con el software *SMART v3 (Panlab)* y se tuvieron en cuenta los 2 primeros minutos del examen, excepto en la latencia de entrada al centro por primera vez que se evaluó durante la totalidad del examen (10 min).

### **2.14. Pruebas funcionales**

Las pruebas funcionales no se llevaron a cabo en nuestro laboratorio ya que no disponemos de los instrumentos necesarios para su realización. La prueba funcional para medir la audición (ABR) se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (Madrid) por el grupo de la Dra. Isabel Varela-Nieto. Mientras que las pruebas funcionales para medir la agudeza visual se llevaron a cabo en la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid) por el grupo del Dr. Pedro de la Villa Polo.

#### **2.14.1. Auditory Brainstem Response (ABR)**

El registro de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC o en inglés, *ABR Auditory Brainstem Response*) es una técnica neurofisiológica que permite la obtención de datos de forma rápida, reproducible, cuantitativa y no invasiva, salvaguardando la vida del animal explorado y que proporciona información sobre la funcionalidad de las estructuras nerviosas periféricas y centrales que conforman la vía

auditiva. Esta técnica se basa en la estimulación auditiva con sonidos de características conocidas (frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación, etc.) y posterior registro de la actividad eléctrica generada por las neuronas de la vía auditiva mediante electrodos colocados en posiciones estándar (de manera subdérmica, los electrodos se colocan bajo las orejas y en la parte frontal de la cabeza). El ABR posibilita la determinación del umbral auditivo y de la velocidad de conducción del estímulo sonoro entre los distintos núcleos del tronco cerebral. Estos parámetros se encuentran muy afectados en ciertas alteraciones severas del desarrollo y pueden ser valorados *in vivo* de un modo rápido y cuantitativo. La estimulación auditiva puede realizarse mediante dos tipos de sonidos: el “click” es un estímulo auditivo inespecífico compuesto por el espectro de frecuencias audibles y que activa a todas las neuronas del receptor auditivo; el “tono” es un estímulo auditivo formado por una frecuencia específica (y armónicas) y que estimula una región concreta del órgano de Corti.

#### **2.14.2. Electrorretinograma (ERG)**

El electroretinograma (ERG) es un método no invasivo y muy sensible para evaluar la función retiniana. Este test mide la respuesta eléctrica de las células de la retina frente a diferentes estímulos lumínicos, permitiendo determinar el grado de neurodegeneración en la retina. El ERG permite medir la respuesta eléctrica retiniana tanto en condiciones fotópicas (de alta luminosidad) como escotópicas (de baja luminosidad). En condiciones escotópicas, los ratones fueron previamente adaptados a la oscuridad antes de exponerlos a flashes de baja intensidad lumínica para medir la respuesta de los bastones y de las neuronas que hacen sinapsis con ellos. La adaptación previa es crucial para maximizar la respuesta estos fotorreceptores y la dependiente de éstos y minimizar la de los conos. Por el contrario, en condiciones fotópicas, los ratones fueron previamente adaptados a condiciones de alta luminosidad antes de exponerlos a flashes de alta intensidad lumínica para medir la respuesta eléctrica de los conos y la dependiente de éstos. Asimismo, la adaptación a las condiciones fotópicas es esencial para maximizar la respuesta de los conos y minimizar la de los bastones. Además, el ERG también permite medir el tiempo que se tarda en alcanzar el pico de las dos ondas mayoritarias, la onda-a (*a-wave*) y la onda-b (*b-wave*). La primera es una medida de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores a la exposición de flashes breves de luz, mientras que la segunda mide la respuesta de las neuronas en el segundo nivel de sinapsis con los fotorreceptores.

Antes de iniciar las pruebas, los ratones fueron anestesiados con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (13 mg/kg). Seguidamente, se aplicaron gotas en los ojos con 1% atropina sulfato, 2.5% *phenylephrine hydrochloride* y 0.5% *proparacaine hydrochloride*, dejando las gotas durante 2 min en los ojos, limpiándolas con un algodón y repitiendo el proceso una segunda vez. Posteriormente, los ojos se mantuvieron hidratados con un ungüento hasta la aplicación de las lentes de contacto con los electrodos. A continuación, se situaron los animales en una plataforma atemperada para mantener la temperatura corporal y se les colocaron los electrodos de manera subdérmica en la base de la cola y entre los ojos. Se aplicaron las lentes de contacto con los electrodos en las córneas y posteriormente se realizaron las pruebas en condiciones escotópicas (**Tabla 9**) y fotópicas (**Tabla 10**). En condiciones escotópicas, cada estímulo se realizó por quintuplicado, a la frecuencia de pulso de 0.2 Hz y con la frecuencia de muestra de 1.000 Hz. En condiciones fotópicas, los ratones fueron adaptados a la luz durante 10 min a una intensidad lumínica de 20 cd/s/m<sup>2</sup> y cada estímulo se repitió 25 veces a una frecuencia de 1 Hz y con la frecuencia de muestra de 1.000 Hz.

**Tabla 9. Condiciones escotópicas.**

Estímulo	1	2	3	4	5	6	7	8
Intensidad de pulso (cd/s/m <sup>2</sup> )	0.001	0.002	0.05	0.1	0.78	0.1	5	10

**Tabla 10. Condiciones fotópicas.**

Estímulo	1	2	3	4	5	6
Intensidad de pulso (cd/s/m <sup>2</sup> )	0.78	1	2.25	5	10	20

### 2.14.3. Optomotor Response

La prueba *Optomotor Response* (OR) permite evaluar la agudeza visual y la sensibilidad al contraste. Esta prueba consiste en un cubo cuyas paredes laterales las conforman pantallas LED en donde se emite una imagen de gradilla de barras verticales blancas y negras que va cambiando de frecuencia e intensidad, creando un cilindro virtual alrededor del ratón. Los animales se situaron en el centro de la arena del cubo de 33.5 x 26.5 x 32.5 cm y la cámara situada en la tapa superior de éste monitorizaba

los movimientos de los ratones y los procesaba con el software OptoMotry; CerebralMechanics, Lethbride (Alberta, Canadá). En las pantallas se emitió la imagen de gradilla a una intensidad de 0.22 cd/s/m<sup>2</sup> de media para las barras negras y de 152.13 cd/s/m<sup>2</sup> de media para las barras blancas. La frecuencia se fue aumentando 12 grados/s y el movimiento de los ratones se analizó hasta que fueron incapaces de distinguir la imagen, momento que se dedujo a partir de que sus movimientos eran hacia cualquier parte del cubo indistintamente.

#### **2.14.4. Visual Water Task**

El aparato básico del *Visual Water Task* (VWT) consta de una piscina de forma trapezoidal con dos monitores controlados por ordenador colocados uno al lado del otro en un extremo. La piscina y los monitores están situados en una superficie sólida de 183 cm de largo x 82 cm de ancho x 73 cm de alto y con un orificio de drenaje de 10 cm de diámetro. La piscina está hecha de plexiglás transparente de 6 mm y consta de un suelo rectangular de 140 cm de largo x 80 cm de ancho y paredes de 55 cm de alto. La piscina es más ancha en un extremo (80 cm) que el otro (25 cm) y las paredes y el extremo estrecho están tintados con pintura negra para reducir los reflejos. Los divisores también están pintados de negro mate en ambos lados para hacerlos opacos y reducir los reflejos dentro de la piscina. Una plataforma de escape portátil de 37 cm de largo x 13 cm de ancho x 14 cm de alto se coloca debajo de uno de los monitores y una rampa de liberación de 35 cm de largo x 7 cm de ancho x 20 cm de alto para ratones se centra en el estrecho final de la piscina. La piscina está llena de agua tibia (22 °C) a una profundidad de 15 cm (**Figura X**).

En primer lugar, se entrenó a los ratones para que hicieran una discriminación visual simple de manera confiable, y luego, en tres etapas más, se cambiaron gradualmente a la tarea *Trial-unique, delayed, matching-to-sample* (DMTS). Se exhibieron imágenes en blanco y negro en pantallas como estímulos visuales, y los ratones fueron reforzados para nadar hacia una imagen correcta donde pudieran escapar del agua a una plataforma sumergida. En la etapa final, durante cada ensayo, los ratones vieron una sola imagen en una fase de muestra seleccionada al azar de un conjunto grande, y luego, en una fase de elección, discriminaron la muestra de una imagen nueva, seleccionada al azar del mismo conjunto. La posición izquierda derecha de la imagen correcta variaba aleatoriamente para que la tarea no fuera espacial. La dependencia del retraso de la memoria para la imagen de muestra se midió variando sistemáticamente el retraso (de 10 segundos a 120 minutos) entre la muestra y las fases de elección.

### **2.15. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante la prueba t de Student en el caso de comparar el grupo de estudio con un grupo control o con el análisis de la variancia de un factor (ANOVA) para las comparaciones múltiples de varios grupos contra un grupo control, que se realizaron con el post-test de Tukey o Dunnet (para los tests del *Optomotor Response* o el *Visual Water Task*). La significancia estadística se determinó cuando  $p < 0.05$ . El método de Kaplan-Meier se utilizó para el cálculo de la supervivencia.





## ***VIII. Bibliografía***



Anthony O Fedele. 2015. "Sanfilippo Syndrome: Causes, Consequences, and Treatments." *The Application of Clinical Genetics* 8: 269–81.

Aronovich, Elena L., and Perry B. Hackett. 2015. "Lysosomal Storage Disease: Gene Therapy on Both Sides of the Blood-Brain Barrier." *Mol Genet Metab* 114(2): 83–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410058> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719214003060>.

Ashikari-Hada, Satoko, Hiroko Habuchi, Yutaka Kariya, and Koji Kimata. 2005. "Heparin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor165- Dependent Mitogenic Activity, Tube Formation, and Its Receptor Phosphorylation of Human Endothelial Cells: Comparison of the Effects of Heparin and Modified Heparins." *Journal of Biological Chemistry* 280(36): 31508–15.

Ashworth, Jane L., S. Biswas, E. Wraith, and I. C. Lloyd. 2006. "The Ocular Features of the Mucopolysaccharidoses." *Eye* 20(5): 553–63.

Atchison, Robert W., Bruch C. Casto, and William Mc D. Hammon. 1965. "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* 149(3685): 754–56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14325163/> (November 20, 2020).

Ayuso, E. et al. 2010. "High AAV Vector Purity Results in Serotype- and Tissue-Independent Enhancement of Transduction Efficiency." *Gene Therapy* 17(4): 503–10.

Bame, K. J. 2001. "Heparanases: Endoglycosidases That Degrade Heparan Sulfate Proteoglycans." *Glycobiology* 11(6): 91–98.

Bax, M. C.O., and G. A. Colville. 1995. "Behaviour in Mucopolysaccharide Disorders." *Archives of Disease in Childhood* 73(1): 77–81.

Beesley, Clare E., Elisabeth P. Young, Ashok Vellodi, and Bryan G. Winchester. 1998. "Identification of 12 Novel Mutations in the  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase Gene in 14 Patients with Sanfilippo Syndrome Type B (Mucopolysaccharidosis Type IIIB)." *Journal of Medical Genetics* 35(11): 910–14.

Belur, Lalitha R. et al. 2020. "Intravenous Delivery for Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I: A Comparison of AAV Serotypes 9 and Rh10." *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 24(May): 100604. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100604>.

Benchorin, Gillie, Melissa Calton, Marielle Beaulieu, and Douglas Vollrath. 2017. "Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography." *Bio-Protocol* 7(7).

Birrane, Gabriel et al. 2019. "Structural Characterization of the  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase, a Key Enzyme in the Pathogenesis of Sanfilippo Syndrome B." *Journal of Structural Biology* 205(3): 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.02.005>.

Braulke, Thomas, and Juan S. Bonifacino. 2009. "Sorting of Lysosomal Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(4): 605–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.016>.

Büning, Hildegard et al. 2008. "Recent Developments in Adeno-Associated Virus Vector Technology." *Journal of Gene Medicine* 10(7): 717–33. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18452237/> (November 20, 2020).

Cai, Zhigang, Kay Grobe, and Xin Zhang. 2014. "Role of Heparan Sulfate Proteoglycans in Optic Disc and Stalk Morphogenesis." *Developmental Dynamics* 243(10): 1310–16.

Canal, Maria M. et al. 2010. "Circadian Rhythm and Suprachiasmatic Nucleus Alterations in the Mouse Model of Mucopolysaccharidosis IIIB." *Behavioural Brain Research* 209(2): 212–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.045>.

Cleary, M. A., and J. E. Wraith. 1993. "Management of Mucopolysaccharidosis Type III." *Archives of Disease in Childhood* 69(3): 403–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8215557/> (November 20, 2020).

Coelho, J. C. et al. 1997. "Selective Screening of 10,000 High-Risk Brazilian Patients for the Detection of Inborn Errors of Metabolism." *European Journal of Pediatrics* 156: 650–54.

Concolino, Daniela, Federica Deodato, and Rossella Parini. 2018. "Enzyme Replacement Therapy: Efficacy and Limitations." *Italian Journal of Pediatrics* 44(Suppl 2).

Conzelmann, E., and K. Sandhoff. 1983. "Partial Enzyme Deficiencies: Residual Activities and the Development of Neurological Disorders." *Developmental Neuroscience* 6(1): 58–71.

Coutinho, Maria Francisca, Lúcia Lacerda, and Sandra Alves. 2012. "Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review." *Biochemistry Research International* 2012: 16 pages.

Cozma, Claudia et al. 2015. "Diagnosis of Morquio Syndrome in Dried Blood Spots Based on a New MRM-MS Assay." *PLoS ONE* 10(7): 1–14.

Cressant, Arnaud et al. 2004. "Improved Behavior and Neuropathology in the Mouse Model of Sanfilippo Type IIIB Disease after Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer in the Striatum." *Journal of Neuroscience* 24(45): 10229–39.

Delgadillo, Verónica et al. 2013. "Natural History of Sanfilippo Syndrome in Spain." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24314109/> (November 20, 2020).

Dierks, Thomas et al. 2009. "Molecular Basis of Multiple Sulfatase Deficiency, Mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 Disease - Lysosomal Storage Disorders Caused by Defects of Non-Lysosomal Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(4): 710–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.015>.

van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, Janse HC, Poorthuis BJ, van Pelt J, Kamerling JP, Galjaard H. 1990. "A Fluorimetric Enzyme Assay for the Diagnosis of Morquio Disease Type A (MPS IV A)." *Clin Chim Acta* 187(2): 131–39.

DiRosario, Julianne et al. 2009. "Innate and Adaptive Immune Activation in the Brain of MPS IIIB Mouse Model." *Journal of Neuroscience Research* 87(4): 978–90.

Donsante, A., B. Levy, C. Vogler, and M. S. Sands. 2007. "Clinical Response to Persistent, Low-Level  $\beta$ -Glucuronidase Expression in the Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type VII." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30(2): 227–38.

Dreyfuss, Juliana L. et al. 2009. "Heparan Sulfate Proteoglycans: Structure, Protein Interactions and Cell Signaling." *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 81(3): 409–29.

Duan, Dongsheng. 2018. "Systemic AAV Micro-Dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy." *Molecular Therapy* 26(10): 2337–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>.

Duve, Christian De. 2005. "The Lysosome Turns Fifty." *Nature cell biology* 7(9): 847–49. <http://www.nature.com/ncb/journal/v7/n9/abs/ncb0905-847.html>.

Ellinwood, N. Matthew et al. 2011. "Safe, Efficient, and Reproducible Gene Therapy of the Brain in the Dog Models of Sanfilippo and Hurler Syndromes." *Molecular Therapy* 19(2): 251–59. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.265>.

Emre, Serap et al. 2002. "Sanfilippo Syndrome in Turkey: Identification of Novel Mutations in Subtypes A and B." *Human mutation* 19(2): 184–85.

Freeman, Stephen D., Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, and Raj K. Ladher. 2015. "Expression of the Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the Avian and Mammalian Inner Ear Suggests a Role for Sulfation during Inner Ear Development." *Developmental Dynamics* 244(2): 168–80.

Fu, H. et al. 2007. "Significantly Increased Lifespan and Improved Behavioral Performances by RAAV Gene Delivery in Adult Mucopolysaccharidosis IIIB Mice." *Gene Therapy* 14(14): 1065–77.

Fu, Haiyan et al. 2011. "Correction of Neurological Disease of Mucopolysaccharidosis IIIB in Adult Mice by RAAV9 Trans-Blood-Brain Barrier Gene Delivery." *Molecular Therapy* 19(6): 1025–33. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.34>.

Futerman, Anthony H., and Gerrit Van Meer. 2004. "The Cell Biology of Lysosomal Storage Disorders." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(7): 554–65.

Gallagher, J. T. 2006. "Multiprotein Signalling Complexes: Regional Assembly on Heparan Sulphate." *Biochemical Society Transactions* 34(3): 438–41.

Ganesh, Anuradha, Zandre Bruwer, and Khalid Al-Thihli. 2013. "An Update on Ocular Involvement in Mucopolysaccharidoses." *Current Opinion in Ophthalmology* 24(5): 379–88.

Gao, Guang Ping et al. 2002. "Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11854–59.

Gao, Guangping, Luk Vandenberghe, and James Wilson. 2005. "New Recombinant Serotypes of AAV Vectors." *Current Gene Therapy* 5(3): 285–97.

Garcia, Antony R. et al. 2007. "Preclinical Dose Ranging Studies for Enzyme Replacement Therapy with Idursulfase in a Knock-out Mouse Model of MPS II." *Molecular Genetics and Metabolism* 91(2): 183–90.

Gökdoğan, Çağil et al. 2016. "Audiologic Evaluations of Children with Mucopolysaccharidosis." *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 82(3): 281–84.

Greiner-Tollersrud, Ole Kristian, and Thomas Berg. 2005. "Lysosomal Storage Disorders." *Indian Pediatrics* 41(3): 260–65.

Gurda, Brittney L. et al. 2016. "Evaluation of AAV-Mediated Gene Therapy for Central Nervous System Disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII." *Molecular Therapy* 24(2): 206–16. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.189>.

- Haurigot, Virginia et al. 2013. "Whole Body Correction of Mucopolysaccharidosis IIIA by Intracerebrospinal Fluid Gene Therapy." *Journal of Clinical Investigation* 123: 3254–71.
- Heldermon, Coy D. et al. 2007. "Development of Sensory, Motor and Behavioral Deficits in the Murine Model of Sanfilippo Syndrome Type B." *PLoS ONE* 2(8).
- Héron, Bénédicte et al. 2011. "Incidence and Natural History of Mucopolysaccharidosis Type III in France and Comparison with United Kingdom and Greece." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 155(1): 58–68.
- Hintze, Jonathan P. et al. 2011. "Comparison of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Sandwich ELISA for Determination of Keratan Sulfate in Plasma and Urine." *Biomarker Insights* 6: 69–78.
- Hirsch, Matthew L., Sonya J. Wolf, and R. J. Samulski. 2016. "Delivering Transgenic DNA Exceeding the Carrying Capacity of AAV Vectors." In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 21–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26611576/> (November 20, 2020).
- Hoggan, MD, NR Blacklow, and WP Rowe. 1966. "Studies of Small Dna Viruses Found in Various." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55(6): 1467–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.6.1467>.
- Im, D S, and N Muzyczka. 1992. "Partial Purification of Adeno-Associated Virus Rep78, Rep52, and Rep40 and Their Biochemical Characterization." *Journal of Virology* 66(2): 1119–28.
- Joseph Phillips, M. et al. 2010. "Retinal Function and Structure in Ant1-Deficient Mice." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(12): 6744–52.
- Van De Kamp, J. J.P., M. F. Niermeijer, K. Von Figura, and M. A.H. Giesberts. 1981. "Genetic Heterogeneity and Clinical Variability in the Sanfilippo Syndrome (Types A, B, and C)." *Clinical Genetics* 20(2): 152–60.
- Kan, Shih Hsin et al. 2014. "Insulin-like Growth Factor II Peptide Fusion Enables Uptake and Lysosomal Delivery of  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase to Mucopolysaccharidosis Type IIIB Fibroblasts." *Biochemical Journal* 458(2): 281–89. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24266751/> (November 20, 2020).
- Kane, Kelly L. et al. 2012. "Genetic Background Effects on Age-Related Hearing Loss Associated with *Cdh23* Variants in Mice." *Hearing Research* 283(1–2): 80–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138310/> (November 20, 2020).



Kaufmann, Kerstin B. et al. 2013. "Gene Therapy on the Move." *EMBO Molecular Medicine* 5: 1642–61.

Klein, Reinhard et al. 2006. "WPRE-Mediated Enhancement of Gene Expression Is Promoter and Cell Line Specific." *Gene* 372(1–2): 153–61.

Kowalewski, Björn et al. 2012. "Arylsulfatase G Inactivation Causes Loss of Heparan Sulfate 3-O-Sulfatase Activity and Mucopolysaccharidosis in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(26): 10310–15.

Kreuger, Johan et al. 2005. "Fibroblast Growth Factors Share Binding Sites in Heparan Sulphate." *Biochemical Journal* 389(1): 145–50.

Langford-Smith, A. et al. 2011. "Hyperactive Behaviour in the Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Iiib in the Open Field and Home Cage Environments." *Genes, Brain and Behavior* 10(6): 673–82.

Leinekugel, P., S. Michel, E. Conzelmann, and K. Sandhoff. 1992. "Quantitative Correlation between the Residual Activity of  $\beta$ -Hexosaminidase A and Arylsulfatase A and the Severity of the Resulting Lysosomal Storage Disease." *Human Genetics* 88(5): 513–23.

Lentz, Thomas B., Steven J. Gray, and R. Jude Samulski. 2012. "Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System." *Neurobiology of Disease* 48(2): 179–88.

Leung LS, Weinstein GW, Hobson RR. 1971. "Further Electroretinographic Studies of Patients with Mucopolysaccharidoses." *Birth Defects Original Article Series* 7(3): 32–40.

Li, H H et al. 1999. "Mouse Model of Sanfilippo Syndrome Type B Produced by Targeted Disruption of the Gene Encoding Alpha-N-Acetylglucosaminidase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14505–10.

Li, Hong Hua et al. 2002. "Attenuated Plasticity in Neurons and Astrocytes in the Mouse Model of Sanfilippo Syndrome Type B." *Journal of Neuroscience Research* 69(1): 30–38.

M., Rohrbach, and Clarke J.T.R. 2007. "Treatment of Lysosomal Storage Disorders: Progress with Enzyme Replacement Therapy." *Drugs* 67(18): 2697–2716. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L350224380>.

Mahon, Louise Victoria et al. 2014. "Assessment of Sleep in Children with Mucopolysaccharidosis Type III." *PLoS ONE* 9(2): 1–7.

Manno, Catherine S. et al. 2006. "Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response." *Nature Medicine* 12(3): 342–47.

Marcó, Sara, Virginia Haurigot, and Fatima Bosch. 2019. "In Vivo Gene Therapy for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome): A New Treatment Horizon." *Human Gene Therapy* 30(10): 1211–21.

McCarty, Douglas M. et al. 2011. "Differential Distribution of Heparan Sulfate Glycoforms and Elevated Expression of Heparan Sulfate Biosynthetic Enzyme Genes in the Brain of Mucopolysaccharidosis IIIB Mice." *Metabolic Brain Disease* 26(1): 9–19.

Meikle, Peter J., John J. Hopwood, Alan E. Clague, and William F. Carey. 1999. "Prevalence of Lysosomal Storage Disorders." *JAMA: the journal of the American Medical Association* 281: 249–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918480>.

Mesolella, M et al. 2013. "Management of Otolaryngological Manifestations in Mucopolysaccharidoses: Our Experience." *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale* 33(4): 267–72.

Meyer, Ann et al. 2007. "Scoring Evaluation of the Natural Course of Mucopolysaccharidosis Type IIIA (Sanfilippo Syndrome Type A)." *Pediatrics* 120(5).

Mindell, Joseph A. "Lysosomal Acidification Mechanisms for Annual Reviews in Physiology."

Mingozzi, Federico et al. 2009. "AAV-1-Mediated Gene Transfer to Skeletal Muscle in Humans Results in Dose-Dependent Activation of Capsid-Specific T Cells." *Blood* 114(10): 2077–86.

Mingozzi, Federico, and Katherine A. High. 2011. "Therapeutic in Vivo Gene Transfer for Genetic Disease Using AAV: Progress and Challenges." *Nature Reviews Genetics* 12(5): 341–55. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2988>.

Del Monte MA, Maumenee IH, Green WR, Kenyon KR. 1983. "Histopathology of Sanfilippo's Syndrome." *Arch Ophthalmol* 101(8): 1255–62.

Moog, Ute et al. 2007. "Is Sanfilippo Type B in Your Mind When You See Adults with Mental Retardation and Behavioral Problems?" *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics* 145(3): 293–301.

Morla, Shraavan. 2019. "Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation." *International Journal of Molecular Sciences* 20(8).

Motas, Sandra et al. 2016. "CNS-Directed Gene Therapy for the Treatment of Neurologic and Somatic Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome)." *JCI Insight* 1(9): 1–18.

Muenzer, Joseph. 2011. "Overview of the Mucopolysaccharidoses." *Rheumatology* 50(SUPPL. 5).

Murrey, Darren A. et al. 2014. "Feasibility and Safety of Systemic RAAV9-HNAGLU Delivery for Treating Mucopolysaccharidosis IIIB: Toxicology, Biodistribution, and Immunological Assessments in Primates." *Human Gene Therapy Clinical Development* 25(2): 72–84.

Naldini, Luigi. 2015. "Gene Therapy Returns to Centre Stage." *Nature* 526(7573): 351–60.

Nash, Kevin, Weijun Chen, and Nicholas Muzyczka. 2008. "Complete In Vitro Reconstitution of Adeno-Associated Virus DNA Replication Requires the Minichromosome Maintenance Complex Proteins." *Journal of Virology* 82(3): 1458–64.

Neufeld, E F. 1991. "Lysosomal Storage Diseases." *Annual review of biochemistry* 60(1): 257–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1883197>.

Neufeld, Elizabeth F, and Joseph Muenzer. 2001. "The Mucopolysaccharidoses." *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*: 3421–52.

Ohkuma, S., Y. Moriyama, and T. Takano. 1982. "Identification and Characterization of a Proton Pump on Lysosomes by Fluorescein Isothiocyanate-Dextran Fluorescence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(9 I): 2758–62.

Ohmi, Kazuhiro et al. 2003. "Activated Microglia in Cortex of Mouse Models of Mucopolysaccharidoses I and IIIB." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 1902–7.

Parenti, Giancarlo, Generoso Andria, and Andrea Ballabio. 2015. "Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy." *Annual Review of Medicine* 66: 471–86.

Platt, Frances M et al. 2018. "Lysosomal Storage Diseases." *Nature Reviews Disease Primers* 4(1).

Prusky, Glen T., Paul W.R. West, and Robert M. Douglas. 2000. "Behavioral Assessment of Visual Acuity in Mice and Rats." *Vision Research* 40(16): 2201–9.

Ribera, Albert et al. 2015. "Biochemical, Histological and Functional Correction of Mucopolysaccharidosis Type IIIB by Intra-Cerebrospinal Fluid Gene Therapy." *Human Molecular Genetics* 24: 2078–95.

Roca, Carles et al. 2017. "Disease Correction by AAV-Mediated Gene Therapy in a New Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIID." *Human Molecular Genetics* 26(8): 1535–51.

Samulski, R. J., K. I. Berns, M. Tan, and N. Muzyczka. 1982. "Cloning of Adeno-Associated Virus into PBR322: Rescue of Intact Virus from the Recombinant Plasmid in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(6 I): 2077–81.

Samulski, R. Jude, and Nicholas Muzyczka. 2014. "AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes." *Annual Review of Virology* 1(1): 427–51.

Santos, Saturnino, Laura López, Luis González, and M. Jesús Domínguez. 2011. "Hipoacusia y Problemas de Vía Aérea En Niños Con Mucopolisacaridosis." *Acta Otorrinolaringologica Espanola* 62(6): 411–17.

Sawamoto, Kazuki et al. 2018. "Gene Therapy for Mucopolysaccharidoses." *Molecular Genetics and Metabolism* 123(2): 59–68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29295764/> (November 20, 2020).

Scallan, Ciaran D. et al. 2006. "Human Immunoglobulin Inhibits Liver Transduction ByAAV Vectors at Low AAV2 Neutralizing Titers in SCID Mice." *Blood* 107(5): 1810–17.

Schmidtchen, Artur et al. 1998. "NAGLU Mutations Underlying Sanfilippo Syndrome Type B." *American Journal of Human Genetics* 62(1): 64–69.

Schnepp, Bruce C. et al. 2005. "Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues." *Journal of Virology* 79(23): 14793–803.

Schueler, U. H. et al. 2004. "Correlation between Enzyme Activity and Substrate Storage in a Cell Culture Model System for Gaucher Disease." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27(5): 649–58.

Schultz, Brian R., and Jeffrey S. Chamberlain. 2008. "Recombinant Adeno-Associated Virus Transduction and Integration." *Molecular Therapy* 16(7): 1189–99. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.103>.

Settembre, Carmine, Alessandro Fraldi, Diego L Medina, and Andrea Ballabio. 2013. "Signals from the Lysosome: A Control Centre for Cellular Clearance and Energy Metabolism." *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(5): 283–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609508>.

Sorrentino, Nicolina Cristina et al. 2016. "A Comprehensive Map of CNS Transduction by Eight Recombinant Adeno-Associated Virus Serotypes upon Cerebrospinal Fluid Administration in Pigs." *Molecular Therapy* 24(2): 276–86. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.212>.

Srivastava, C. H. et al. 1989. "Construction of a Recombinant Human Parvovirus B19: Adeno-Associated Virus 2 (AAV) DNA Inverted Terminal Repeats Are Functional in a AAV-B19 Hybrid Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(20): 8078–82.

Stewart, Mark D., and Ralph D. Sanderson. 2014. "Heparan Sulfate in the Nucleus and Its Control of Cellular Functions." *Matrix Biology* 35: 56–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.009>.

Sugahara, Kazuyuki, and Hiroshi Kitagawa. 2002. "Heparin and Heparan Sulfate Biosynthesis." *IUBMB Life* 54(4): 163–75.

Summers, C. Gail, and Jane L. Ashworth. 2011. "Ocular Manifestations as Key Features for Diagnosing Mucopolysaccharidoses." *Rheumatology* 50(SUPPL. 5): 34–40.

Sun, Angela. 2018. "Lysosomal Storage Disease Overview." *Annals of Translational Medicine* 6(24): 476.-476.

Sundin, Olof H. 2005. "The Mouse's Eye and Mfrp: Not Quite Human." *Ophthalmic Genetics* 26(4): 153–55.

Tamagawa, K et al. 1985. "Neuropathological Study and Chemico-Pathological Correlation in Sibling Cases of Sanfilippo Syndrome Type B." *Brain Dev* 7: 599–609. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3938624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3938624).

Tardieu, Marc et al. 2014. "Intracerebral Administration of Adeno-Associated Viral Vector Serotype Rh.10 Carrying Human SGSH and SUMF1 Cdnas in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIA Disease: Results of a Phase I/II Trial." *Human Gene Therapy* 25(6): 506–16.

- . 2017. “Intracerebral Gene Therapy in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIB Syndrome: An Uncontrolled Phase 1/2 Clinical Trial.” *The Lancet Neurology* 16(9): 712–20.
- Taylor, Kristen R., and Richard L. Gallo. 2006. “Glycosaminoglycans and Their Proteoglycans: Host-associated Molecular Patterns for Initiation and Modulation of Inflammation.” *The FASEB Journal* 20(1): 9–22.
- Tomatsu, Shunji et al. 2010. “Validation of Keratan Sulfate Level in Mucopolysaccharidosis Type IVA by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33(SUPPL. 3).
- . 2014. “Morquio A Syndrome: Diagnosis and Current and Future Therapies.” *Pediatric Endocrinology Reviews* 12(0 1): 141–51.
- Touahri, Yacine et al. 2020. “Focused Ultrasound as a Novel Strategy for Noninvasive Gene Delivery to Retinal Müller Glia.” *Theranostics* 10(7): 2982–99.
- Tse, Dennis Y. et al. 2015. “Electrophysiological and Histological Characterization of Rod-Cone Retinal Degeneration and Microglia Activation in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIB.” *Scientific Reports* 5(November): 1–15.
- Valstar, M. J. et al. 2008. “Sanfilippo Syndrome: A Mini-Review.” *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31(2): 240–52.
- Valstar, Marlies J., Sanne Neijls, et al. 2010. “Mucopolysaccharidosis Type IIIA: Clinical Spectrum and Genotype-Phenotype Correlations.” *Annals of Neurology* 68(6): 876–87.
- Valstar, Marlies J., Hennie T. Bruggenwirth, et al. 2010. “Mucopolysaccharidosis Type IIIB May Predominantly Present with an Attenuated Clinical Phenotype.” *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33(6): 759–67.
- Valstar, Marlies J., Aida M. Bertoli-Avella, et al. 2010. “Mucopolysaccharidosis Type IIID: 12 New Patients and 15 Novel Mutations.” *Human Mutation* 31: 1348–60.
- Villani, Guglielmo R.D. et al. 2007. “Cytokines, Neurotrophins, and Oxidative Stress in Brain Disease from Mucopolysaccharidosis IIIB.” *Journal of Neuroscience Research* 85(3): 612–22.
- Wang, Dan, Phillip W.L. Tai, and Guangping Gao. 2019. “Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery.” *Nature Reviews Drug Discovery* 18(5): 358–78. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>.

White, Hunter J., and Diana C. Peterson. 2019. StatPearls Anatomy, Head and Neck, Ear Organ of Corti. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855919> (November 20, 2020).

Whitley, Chester B. et al. 2018. "Observational Prospective Natural History of Patients with Sanfilippo Syndrome Type B." *Journal of Pediatrics* 197: 198-206.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.01.044>.

Wijburg, Frits A. et al. 2019. "Intrathecal Heparan-N-Sulfatase in Patients with Sanfilippo Syndrome Type A: A Phase IIb Randomized Trial." *Molecular Genetics and Metabolism* 126(2): 121–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.006>.

Wilcox, William R. 2004. "Lysosomal Storage Disorders: The Need for Better Pediatric Recognition and Comprehensive Care." *Journal of Pediatrics* 144(5 SUPPL.).

Wilhelm, Carolyn M. et al. 2018. "Natural History of Echocardiographic Abnormalities in Mucopolysaccharidosis III." *Molecular Genetics and Metabolism* 124(2): 131–34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29735373/> (November 20, 2020).

Wilhelm, Carolyn M et al. 2020. "HHS Public Access." 124(2): 131–34.

Yogalingam, Gouri, and John J. Hopwood. 2001. "Molecular Genetics of Mucopolysaccharidosis Type IIIA and IIIB: Diagnostic, Clinical, and Biological Implications." *Human Mutation* 18(4): 264–81.

