



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desenvolupament d'una estratègia de teràpia gènica pel tractament de l'Acidúria Glutàrica tipus I

Anna Mateu Bosch

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Desenvolupament d'una estratègia de teràpia gènica pel tractament de l'Acidúria Glutàrica tipus 1

Programa de Doctorat en Biomedicina



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Doctorand:
Anna Mateu Bosch

Directora i tutora de la tesi:
Cristina Fillat Fonts

Fundació Clínic – Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer

FUNDACIÓ
CLÍNIC
BARCELONA

IDIBAPS
Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
Agustí Pi i Sunyer

Aquesta tesi va per vosaltres,



Agraïments

- Primerament volia donar-te les Cristina, per donar-me la oportunitat i confiar en mi per a formar part del teu grup de Teràpia gènica i Càncer. Per permetre'm desenvolupar com a científica i atorgar-me la llibertat de poder gestionar aquest projecte, però sempre sabent que tenia la tranquil·litat de tenir el teu consell científic.
- Giulia i Estela, us volia agrair el fet de ser els meus grans exemples i acompanyar-me en el procés d'aprenentatge tan complex com es el doctorat. Per ensenyar-me tan, tan a nivell científic com a nivell personal, a gestionar el projecte i les emocions que l'acompanyen. Moltes gràcies per ser sempre allà, heu sigut les millors mestres que podria haver tingut!
- Silvia, des de el primer moment que vam compartir laboratori vaig quedar admirada per la gran científica que ets. Sempre m'has semblat un exemple a seguir. Però no només en qualitat de científica, en molts altres aspectes de la teva vida. Sempre intentes explorar tot els sentits de la vida i qüestionar-te les coses més enllà del que ho fa la majoria. Hi ha poca gent com tu en aquesta vida i soc molt afortunada de que els nostres camins s'hagin creuat, perquè crec que he guanyat una amiga.
- Laia, he tingut molta sort de tenir-te com a companya de projecte. Sempre en sintonia, i tens una gran energia i vitalitat que fas que la resta del món giri. En els moments més baixos has estat allà i tires de les persones quan elles no arriben. Per això i molt més et mereixes que et digui la gran sort que tinc de tenir-te i que sense tu això no hagués estat possible. Sempre amb el teu somriure fent que la resta se senti especial, i com ens van dir "Muchas gracias por el esfuerzo es fantastico lo que estais haciendo y es muy esperanzador. Un abrazo de las familias". Només per això val la pena l'esforç. Segueix sempre amb aquesta positivitat que contagia.
- Marc, lo nostre es com un matrimoni de molts anys, 9 anys ja, que ha tingut els seus bons moments i els seus estira i arronses. Se que es complicat la convivència amb una maníaca de l'ordre i un Diògenes, però eh, ens em gestionat prou bé. Volia agrair-te tots els bons moments viscut junts, ja que ens son molts i sempre han sigut de risas. Les 140.456 trillions de hores que m'has acompanyat a l'estabulari, que més que formació ha estat recolzament moral per a mi. Agrair-te que sempre treus un somriure a la gent, ja sigui amb un pastis o amb la teva visió de la vida. Gràcies per ser el meu company de camí, ha estat un plaer molt divertit.

- Sabri, no te voy a ser incincera. Ets la meva gran companya de memes i amb la que només mirar-nos sabem lo que l'altre pensa (Spiderman). La veritat es que ha estat un plaer ser la teva mentora perquè amb tu ha estat fàcil, aprens ràpid, treballes bé i ets efectiva. Però el més important es que ets comprensiva i detallista, i amb tu sempre hi ha bon rollo i bon humor. Gràcies per tots els moments viscuts juntes, perquè no podria demanar-te res més. Ets increïble! “No lo digo yo, lo dice la ciencia”.
Et volia desitjar també molta sort en la nova etapa que comences, que segur que et t'anirà bé perquè “no tengo pruebas pero tampoco dudas”.
- Marta i Francesc, sou els últims en incorporar-vos al grup i amb els que menys temps he passat però ha estat un plaer compartir aquest temps amb vosaltres sou grans persones i grans companys. Moltes gràcies per tot!
- Montse B.N, només tu saps el camí que he patit per arribar fins aquí i l'esforç que hagut de fer. Volia donar-te les gràcies per què sense el teu recolzament jo se que això no hagués estat possible. Tu em vas guiar per trobar la meva força i per aprendre a creure en mi, a deixar de demanar perdo i abaixar el cap, i a ser la persona que sóc avui. No hi ha temps ni diners al món per compensar el que m'has donat. T'estaré sempre agraïda.
- Ferran, abans de conèixer-te no sabia el que era sentir l'amor incondicional d'algú. El fet de sentir-me sola i d'estar sempre al peu del canyó de tot, ha sigut sempre la meva forma de vida. Però el fet de que entressis, m'aportessis amor i em fessis sentir que on no arribés jo arribaries tu o faries perquè hi arribés, ha estat l'acte d'amor més bonic que he viscut mai. Sentir-me aollida, estimada, compresa i acompanyada en els meus somnis i il·lusions es el millor regal que em podies donar fins ara. Moltes gràcies per tot el recolzament i comprensió que he rebut durant l'ardu camí que es el doctorat. T'estimo i t'estimaré sempre molt i molt!
- Volia agrair també a tots aquells amics i amigues i família que ha format part dels moments de desconexió, disbauxa i somriures que tan bé m'han anat per a recarregar piles i, a vegades, agafar una miqueta de distancia. En especial, volia agrair a la Elisa per aportar el seu granet de sorra amb la seva gran capacitat artística i donar-li bellesa a la portada d'aquest projecte.
- Finalment volia agrair-vos, a l'associació de les Famílies GA, per tot el moviment, la lluita i l'energia que poseu en tots els projectes i accions. I l'esforç que, tan els pares com els pacients, poseu cada dia en el vostre dia a dia. Sense la vostra valentia res de tot això seria possible. Gràcies per fer que projectes tan bonics com aquest siguin possibles.

Índex

Abreviacions	1
Presentació	9
1. Introducció	11
1.1 Malalties minoritàries	11
1.1.1 Classificació de les malalties minoritàries	11
1.1.2 Diagnòstic i tractament de les malalties minoritàries	13
1.2 Errors congènits del metabolisme	15
1.2.1 Acidúries orgàniques	15
1.3 Acidúria glutàrica tipus 1	17
1.3.1 Perfil Genètic	17
1.3.2 Classificació del pacients en funció del perfil genètic i excretor	18
1.4 Proteïna glutaril-coA deshidrogenasa (GCDH)	20
1.4.1 Variant patogèniques	21
1.5 Via metabòlica que participa la glutaril-coA deshidrogenasa	22
1.6 Fisiopatologia	23
1.7 Descripció clínica	26
1.7.1 Acidúria glutàrica tipus 1 debut infantil	26
1.7.2 L'acidúria glutàrica d'aparició tardana	27
1.8 Mètodes de diagnòstic	28
1.8.1 Consell Genètic	28
1.9 Tractament	30
1.10 Models	32
1.10.1 Models cel·lulars	32
1.10.2 Models animals	35

1.11 Teràpia gènica	39
1.11.1 Evolució històrica.....	39
1.11.2 Estratègies d'edició genòmica.....	42
1.11.3 Vectors de transferència.....	44
1.11.4 Estratègies de transferència gènica	46
1.11.5 Vies d'administració	47
1.11.6 Aplicacions clíniques	48
1.12 Vectors AAV	50
1.12.1 Característiques moleculars dels AAVs.....	51
1.12.2 Cicle vital del AAV	53
1.12.3 Serotips, tropisme i mecanismes de transducció	55
1.12.4 Limitacions de l'ús de AAV com a vectors	60
1.12.5 Assaigs clínics AAV i productes terapèutics	61
 2.Objectius	 65
 3.Material i Mètodes	 67
3.1. Tècniques de manipulació de bacteris	67
3.1.1. Soca bacteriana: DH5-alfa	67
3.1.2. Tècniques de manipulació bacteriana	67
3.2 Tècniques de manipulació del ADN	69
3.2.1. Aïllament i quantificació d'ADN	69
3.2.2 Aïllament d'ADN viral de teixit	70
3.2.3 Quantificació de l'ADN i determinació de la seva puresa	71
3.2.4 Digestió enzimàtica	72
3.2.5 Lligació.....	73
3.2.6 Tècniques d'amplificació de l'ADN	73
3.2.7 Generació del plasmidi d'expressió de la GCDH (pAAV-CA+GCDH)	75

3.2.8 Seqüenciació d'un fragment d'ADN	76
3.3 Tècniques de manipulació de proteïnes	77
3.3.1 Aïllament de proteïnes	77
3.3.2 Quantificació de proteïnes	77
3.3.3 Western Blot.....	78
3.3.4 Activitat en gel	82
3.4 Assajos funcionals	83
3.4.1 Peroxidació lipídica.....	83
3.4.2 GSH.....	83
3.5 Tècniques de manipulació d'animals.....	84
3.5.1 Administració de AAVs <i>in vivo</i>	84
3.5.2 MRI.	86
3.5.3 Obtenció d'òrgans i teixits murins.	87
3.6 Tècniques histològiques.....	90
3.6.1 Preparació del teixit i obtenció de seccions de cervells per a l'anàlisi histològica	90
3.6.2 Tincions generals	90
3.6.3 Immunohistoquímica sobre seccions de cervell de ratolí.....	91
3.6.4 Anàlisi i quantificació d'histologies	93
3.7 Anàlisi estadística i representació gràfica	95
4. Resultats.....	97
4.1 Anàlisi de la capacitat dels vectors AAV-P- <i>GCDH</i> i AAV- <i>GCDH</i> de transduir els teixits diana de AG1 i avaluació dels seus efectes sobre el contingut de C5DC en ratolins <i>Gcdh</i> -/	97
4.1.1 Construcció dels vectors AAV-P- <i>GCDH</i> i AAV- <i>GCDH</i>	97
4.1.2 Anàlisi de la transducció i efectes sobre el contingut de CD5C en els teixits diana. ...	98
4.2 Estudi dels efectes d'una administració sistèmica (intravenosa) o locoregional (cisterna magna) sobre la capacitat de transducció del vector AAV- <i>GCDH</i>	101
4.2.1 Anàlisi de la transducció després d'una administració intravenosa en diferents etapes del desenvolupament.	101

4.2.2 Anàlisi de la transducció després d'una administració a cisterna magna en diferents etapes del desenvolupament. Estudi comparatiu amb l'administració intravenosa.	104
4.3 Anàlisi dels efectes d'una administració intravenosa sobre l'estabilitat de la transducció a llarg termini.	108
4.4 Estudi dels efectes d'una administració intravenosa del vector AAV- <i>GCDH</i> a ratolins <i>Gcdh</i> -/- nounats (P1) o adults joves (P30) sotmesos a una dieta estàndard o una dieta alta en lisina sobre aspectes de la fisiopatologia metabòlica a diferents temps post-administració.	113
4.4.1. Efectes sobre el contingut de metabòlits.....	113
4.4.2 Efectes sobre l'homeòstasi redox en teixits cerebrals.....	126
4.5 Estudi dels efectes d'una administració sistèmica neonatal, del vector AAV- <i>GCDH</i> , sobre les alteracions neuropatològiques dels ratolins <i>Gcdh</i> -/.....	129
4.5.1 Estudi neuropatològic.....	129
4.5.2 Anàlisi per ressonància magnètica.	136
4.5.3 Estudi de supervivència.....	141
5. Discussió	143
5.1 Disseny i construcció del vector	144
5.2 Transducció als teixits diana: fetge, ronyó i teixits neuronals.	146
5.3 Correcció de les alteracions fenotípiques en el model murí de AG1	150
5.4 Potencial de translació a pacients amb acidúria glutàrica.....	155
6. Conclusions.....	159
7. Bibliografia.....	161

Abreviacions

%	Percentatge
¹H RMN	Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear d'hidrogen
2D	Dues dimensions
3D	Tres dimensions
3-OHGA	Àcid 3- hidroxiglutàric
α	Alfa
α	Coeficient d'extinció a 260nm
A	Absorbància
A	Adenina
AADC	Deficiència severa de la L-aminoàcid descarboxilasa aromàtica
AAP	Proteïna activadora de l'assemblatge
AASS	Semialdehid sintasa 2-aminoadípica
AAV	Virus adenoassociat
AAV-GCDH	Virus adenoassociat que conté el gen de la GCDH sota el promotor de CAG
AAV-P-GCDH	Virus adenoassociat que conté el gen de la GCDH sota el promotor de PGK
AAVR	Receptor d'AAV
AAVS1	Lloc d'integració del virus adenoassociat 1
ACD	Acil-CoA deshidrogenasa
Ad	Adenovirus
ADA	Adenosina desaminasa
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ala	Alanina
AG1	Acidúria glutàrica tipus 1
AIV	Acidúria isovalèrica
AMM	Acidúria metilmalònica
AP	Acidúria propiònica
APS	Persulfat d'amoni
Arg	Arginina
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Trifosfat d'adenosina

β	Beta
B5	Pantotenat, Àcid Pantotènic o Vitamina B5
BCA	Àcid bicinconínic
BHE	Barrera hematoencefàlica
BSA	Albúmina sèrica bovina
C	Carboxil
C	Citosina
C5DC	Glutarilcarnitina
	C → Element potenciador precoç del citomegalovirus (CMV).
CAG	A → El promotor del gen de la beta-actina de pollastre (primer exó i primer intró).
	G → Acceptor d'unió del gen de la beta-globina del conill.
cap	Gen de la càpside
CAR	Receptor d'antígens quimèrics
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i> (Proteïna associada a CRISPR 9)
CBATEG	Centre de biotecnologia animal i teràpia gènica
CCAA	Comunitats autònomes
CD9	<i>Cluster of differentiation 9</i> (Clúster de diferenciació 9)
CEEA	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
CG	Cromatografia de gasos
cm	Centimetre
c.m	Cisterna Magna
CMV	Citomegalovirus
CoA	Coenzim A
CO₂	Diòxid de carboni
COVID19	Coronavirus
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repeticions palindròmiques curtes agrupades regularment entrespaiades)
Cu^{1+/2+}	Coure (I)/(II)
°C	grau Celsius
DBS	Trencament doble cadena
DM	Difusivitat mitjana
DMD	Distròfia muscular de Duchenne
dNTP	Desoxinucleòtids trifosfat

DTT	Ditiotreitol
DWI	Imatge ponderada per difusió
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EEC	Comunitat Econòmica Europea
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
EIM	Error innat del metabolisme
EM	Espectroscòpia de masses
EMA	Agència Europa del Medicament
ETF	Flavoproteïna de transferència d'electrons
EEUU	Estat Units
FAD	Dinucleòtid de flavina i adenina
FBS	Sèrum Boví Fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administració d'Aliments i Medicaments)
g	Grams
g	Gravetat
G	Guanina
G	Calibre d'agulla (gruix)
GA	Àcid glutàric
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GCDH	Glutaril-CoA deshidrogenasa
GDD	Deficiència de glutaril-CoA deshidrogenasa
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
Gln	Glutamina
Glu	Àcid glutàmic
GSH	Glutatió
gv/vg	Genomes virals
gv/ml	Genomes virals per mil·lilitre
h	Hora
H&E	Hematoxilina i eosina
HBV	Virus de l'hepatitis B
HCV	Virus de l'hepatitis C
HDR	Reparació per homologia
HGFR	Receptor del factor de creixement dels hepatòcits
hGH	Hormona del creixement humana

HIV	Virus de la immunodeficiència humana
HLD	Dieta alta en lisina
HPV	Virus del papil·loma humà
HRP	Peroxidasa de rave
IL2RG	Receptor de la interleucina 2
Indels	Insercions i delecions
iPSC	Cèl·lula mare pluripotent induïda
ITR	Repeticions terminals invertides
i.v	Intravenosa
Kb	Kilobase
Kcal	Kilocaloria
KDa/Kda	Kilodalton
Kg	Kilograms
KO	knock-out
L	Levogir
L	Litre
LB	<i>Luria Broth</i> (Caldo de cultiu de Luria)
LCA	Amaurosis congènita de Leber
LPL	Lipoproteïna lipasa
LR	Receptor de laminina
Lys	Lisina
M	Mes
M	Molar
mA	Miliampers
MAAP	Proteïna accessòria associada a la membrana
Maxiprep	Maxipreparació
MBP	Proteïna bàsica de mielina
MDA	Malondialdehid
Met	Metionina
mg	Mil·ligrams
µg	Micrograms
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> (Herència mendeliana en l'home)
min	Minut
Miniprep	Minipreparacions

miRNA	Àcid ribonucleic micro
µl	Microlitres
ml	Mil·lilitre
µm	Micrometres
µM	Micromolar
µmol	Micromol
mM	Milimolar
mm²	Mil·límetres quadrats
mmol	Milimol
MMRRC	<i>Mutant Mouse Resource and Research Center</i> (Centre de Recursos i Recerca del Ratolí Mutant)
mol	Mol
MRS	Espectroscòpia de ressonància magnètica
N	Amino
n	Mida mostral
NAA	N-acetilaspargat
NAAG	N-acetil-aspartil-glutamat
NaCl	Clorur de sodi
NaOH	Hidròxid de sodi
NBT	Clorur de nitroblue tetrazolium
NeuN	Antigen nuclear neuronal
ng	Nanogram
NHEJ	Reparació per unió d'extrems no homòlegs
nm	Nanòmetre
nmol	Nanomol
OCTN 2/3	<i>Organic cation transporters novel</i> (Transportadors de cations orgànics novel)
ORF	Marc obert de lectura
P	Promotor
P	Postnatal
pA	Poliadenilació
pb	Parells de bases
PBS	Solució salina tamponada amb fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDGFR	Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes

PFA	Paraformaldehid
PGK	Fosfoglicerat quinasa
pH	Potència de l'hidrogen
Pro	Prolina
prot	Proteïna
p-value	Valor de probabilitat
PVDF	Polifluorur de vinilidè
rep	Gen de la replicació
RMN	Ressonància magnètica
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
RPE65	Isomerohidrolasa retinoide del epiteli pigmentat de la retina 65
rpm	Revolució per minut
s	Segon
SCID	Immunodeficiència combinada greu
SD	Dieta estàndard
SDS	Dodecil sulfat de sodi
SEM	Erro estàndard mig
SFDA	<i>State Food and Drug Administration</i> (Administració Estatal d'Aliments i Medicaments)
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
siRNA	Àcid ribonucleic petit d'interferència
SMA	Atrofia muscular espinal
SMN1	Gen de la supervivència de la neurona motora 1
SNC	Sistema nerviós central
SPF	Lliure de patògens específics
SV40	Virus del simi 40
T	Timina
TALEN	Nucleasa d'efectors semblants a l'activador de la transcripció
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Solució salina tamponada amb Tris
TBS-T	Solució salina tamponada amb Tris amb Tween
TCR	Receptor de cèl·lules T
TEMED	Tetrametiletilendiamina
t_e	Temps d'elongació

T_h	Temperatura d'hibridació
Thr	Treonina
Tris-HCl	Clorhidrat de Tris
Trp	Triptòfan
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UPV	Unitat de producció de vectors
Val	Valina
VP	Proteïna virió
WHV	Virus de l'hepatitis de la marmota
WPRE	Element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis de la marmota
WT	Tipus salvatge
X	Cromosoma X
y+	Transportador facilitador bidireccional comú
ZFN	Nucleasa de dit de zinc

Presentació

L'acidúria glutàrica tipus I (AG1) és una malaltia minoritària, autosòmica recessiva, causada per una deficiència en l'enzim glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH). Aquest enzim és responsable de la deshidrogenació i descarboxilació del glutaril-CoA en la via catabòlica de la lisina, la hidroxilisina i el triptòfan. La deficiència de GCDH provoca una acumulació dels metabòlits àcid glutàric (GA), àcid 3-hidroxiglutàric (3-OHGA) i glutarilcarnitina (C5DC) principalment.

Les manifestacions clíniques solen aparèixer entre els 4 i els 14 mesos d'edat, tot i que prèviament es poden observar algunes manifestacions com ara la macrocefàlia, retard psicomotor lleu i hipotonia. En 2/3 dels casos, la malaltia comença bruscament, abans del primer any de vida, amb convulsions focals o generalitzades, vòmits, obnubilació o letargia provocats generalment per una infecció. Després d'un episodi d'aquest tipus, s'observen danys neurològics greus propis d'una crisi encefalopàtica aguda. A l'altre terç dels casos, la malaltia es desenvolupa lentament amb retard psicomotor, hipotonia i postures distòniques. La fisiopatologia de la malaltia s'ha associat fonamentalment als efectes neurotòxics dels metabòlits GA i 3-OHGA. El tractament actual consisteix en una restricció de proteïnes en la dieta amb un suplement de carnitina, el que millora notablement el pronòstic de la malaltia. Des de fa uns anys la AG1 s'ha inclòs com a obligatòria, en els programes de detecció neonatal de les diferents CCAA espanyoles, ja que l'inici primerenc de la restricció dietètica té un impacte molt positiu en l'evolució de la malaltia. Tot i així alguns pacients es mantenen amb dèficits motors i lingüístics, fins i tot quan hi ha bona adherència a la dieta i d'altres no responen be al tractament dietètic. Per tant, continua essent necessari investigar noves opcions terapèutiques.

Els ratolins *Gcdh* ^{-/-} constitueixen un model de la malaltia que recapitula aspectes de la patologia humana. Els animals són viables i no presenten diferències aparents respecte als ratolins de tipus salvatge. No obstant això, presenten un perfil bioquímic força similar als pacients amb AG1, amb alts nivells de GA i 3-OHGA en orina i cervell, alts nivells de C5DC al sèrum, i alguns trets lleus associats a alteracions neuropatològiques. El fenotip dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} s'agreuja quan els animals s'exposen a una dieta rica en lisina. La sobrecàrrega de lisina provoca una crisi metabòlica que cursa amb una alteració significativa dels paràmetres bioquímics en fluids i teixits, alteracions neuropatològiques greus, amb importants lesions estriatals i baixa supervivència.

Els vectors virals adenoassociats (AAV) constitueixen una eina eficaç per vehicular la transferència de gens *in vivo* i han esdevingut una plataforma de teràpia gènica atractiva pel tractament d'alguns grups de malalties humanes.

La naturalesa de la AG1, al tractar-se d'una malaltia monogènica, autosòmica recessiva, amb un ventall ampli de variants patogèniques identificades en el gen de la GCDH, feia pensar que una teràpia gènica de reemplaçament, que permetés l'expressió d'una còpia funcional de la GCDH podria ser una estratègia amb potencial terapèutic. En aquesta tesi s'ha desenvolupat un estudi preclínic de teràpia gènica per a la AG1 en el model de ratolí *Gcdh* *-/-*, utilitzant vectors AAV que transporten una còpia correcta del gen de la GCDH. En primer lloc s'ha fet un estudi comparatiu entre dos vectors AAV en els que la GCDH estava controlada per dos promotors diferents i s'ha seleccionat el vector AAV-GCDH principalment per la seva capacitat d'assolir nivells elevats de GCDH als teixits diana. S'han estudiat també dues vies d'administració, una via sistèmica i una locoregional i s'ha explorat l'administració de la teràpia a diferents etapes postnatales. S'ha explorat la viabilitat de la teràpia gènica *in vivo* en el model preclínic de la malaltia en el context d'un fenotip lleu, condicions de dieta estàndard, o fenotip sever, quan els animals s'alimenten en una dieta alta en lisina i s'han valorat els seus efectes a curt i llarg termini. Els resultats demostren que l'administració intravascular del vector AAV-GCDH a ratolins adults- joves restableix l'expressió de GCDH i la seva activitat enzimàtica principalment a teixits perifèrics, com el fetge o el ronyó, i això es tradueix en una reducció en el contingut de metabòlits principalment en fetge i sèrum que es manté almenys fins a 6 mesos. Tanmateix, l'administració en aquesta etapa i per la via intravenosa dóna lloc a una expressió molt baixa en el teixit nerviós que no corregeix les alteracions metabòliques. Per altra banda, l'aplicació del vector terapèutic als ratolins nous sí que és capaç de restaurar l'expressió de GCDH al cervell (escorça i nucli estriat) que es manté durant almenys sis mesos després del tractament. Amb aquest tractament s'aconsegueix reduir el contingut de metabòlits en el nucli estriat, fins i tot en condicions d'inducció del fenotip sever i millora notablement el dany neuropatològic. A més a més, mentre que només el 40% dels ratolins *Gcdh* *-/-* sobreviuen a una dieta alta en lisina, la teràpia amb AAV-GCDH permet la supervivència del 100% dels ratolins. En conjunt, els resultats d'aquesta tesi suggereixen que la teràpia gènica amb el vector AAV-GCDH podria ser una estratègia terapèutica prometedora per prevenir el desenvolupament de les principals alteracions patològiques de l'AG1.

1. Introducció

1.1 Malalties minoritàries

Les malalties minoritàries, també conegudes com a orfes o rares, són sovint un grup de trastorns greus que tenen una baixa prevalença ¹. Actualment, hi ha aproximadament entre 5.000 i 8.000 malalties rares, i es calcula que 473 milions de persones estan afectades per aquestes malalties arreu del món ². Les malalties rares es defineixen de manera diferent segons la jurisdicció específica responsable de la seva definició. A Europa una malaltia es considera rara si afecta menys d'una de cada 2.000 persones, mentre que als EEUU la seva definició és que afecti a menys de 200.000 persones i al Japó a menys de 50.000 ³. Algunes malalties són més freqüents en regions específiques a causa de mutacions fundadores, i de manera global s'estima que hi ha una mitjana de 40 casos per cada 100.000 persones, amb una prevalença mitjana d'1 de cada 2.500 persones ². Per tant, tot i que les malalties minoritàries individualment són poc freqüents, per definició, afecten a un gran nombre de persones quan les consideres totes en un conjunt.

1.1.1 Classificació de les malalties minoritàries

Actualment, hi ha una classificació oficial de malalties rares elaborada per Orphanet, dividint les malalties minoritàries en 33 grups. Una manera de classificar les diferents malalties orfes, és en funció de les seves causes patològiques que les agruparia en 15 categories (Taula 1) ¹.

Malalties minoritàries	
Trastorns d'emmagatzematge lisosomal	Càncers rars
Trastorns del creixement	Trastorn del moviment
Malalties autoimmunes	Malalties neurològiques
Trastorns de la sang	Malalties cardiovasculars
Trastorns oculars	Trastorns genètics
Trastorns gastrointestinals	Malalties respiratòries
Trastorns infecciosos	Trasplantaments
Altres	

Taula 1. Classificació de les malalties minoritàries en funció de la seva causa.

Adaptació de Klimova 2017.

El 80% de les causes de les malalties minoritàries són d'origen genètic. La majoria són el resultat de defectes en un sol gen (ja sigui amb un patró d'herència dominant o recessiu), però en alguns casos són el resultat de múltiples defectes genètics o multitud de factors⁴. Les malalties minoritàries es produeix per igual tant en adults com en nens, però la seva incidència és molt més alta en nens menors de 10 anys⁵.

Per tant, una altra manera de classificar les malalties rares seria en funció del seu mode d'herència. El 28,1% d'aquestes són d'herència autosòmica recessiva, el 26,5% d'herència autosòmica dominant, el 13,4% són malalties multigèniques/multifactorials, el 10% tenen diversos modes d'herència, el 8,1% són causades per malalties esporàdiques, el 7% tenen una herència lligada al cromosoma X, i el 5,8% són d'etiologia desconeguda (Figura 1)¹.

Mode d'herència

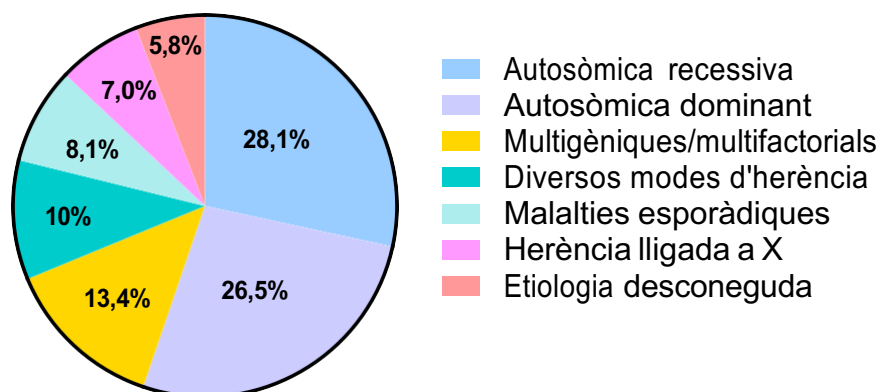


Figura 1. Classificació de les malalties minoritàries en funció del seu mode d'herència.

Adaptació de Klimova 2017.

1.1.2 Diagnòstic i tractament de les malalties minoritàries

Per a la gran majoria de les malalties rares no hi ha tractament i solen tenir una alta taxa de mortalitat. De fet, gran part dels pacients afectats moren abans dels cinc anys de vida, generalment per un diagnòstic incorrecte o tardà ¹.

Moltes malalties rares s'hereten genèticament, per tant les principals tècniques de diagnòstic estan relacionades amb la seqüenciació de l'ADN. Tot i que sovint és complicat fer un diagnòstic degut a l'heterogeneïtat genètica i fenotípica ⁶.

Des del 2010, el nombre de mutacions i de gens descoberts causants de malalties ha crescut gràcies a la millora de les tecnologies de seqüenciació d'ADN. Actualment, hi ha disponibles molts panells comercials de seqüenciació de gens relacionats amb trastorns específics o grups de malalties, i tècniques, com per exemple, la seqüenciació de l'exoma, que permeten una anàlisi més completa. Aquest nou ventall de tècniques ofereixen noves oportunitats per al diagnòstic, el consell genètic i la investigació de les malalties minoritàries ⁷⁻⁹.

El desenvolupament de fàrmacs en general és complex, requereix temps, té un alt cost, i les taxes d'èxit solen ser extremadament baixes. Els medicaments dirigits al tractament de les malalties minoritàries es coneixen com a medicaments orfes i es calcula que es necessiten entre 10 i 12 anys pel seu desenvolupament ¹. Per algunes malalties minoritàries es disposa d'algun tipus de teràpia. Aquestes van des de fàrmacs, l'ús de proteïnes o anticossos monoclonals, teràpies avançades i fins a restriccions en la dieta i complements vitamínics ¹. Es considera que només entre l'1-10% de totes les malalties minoritàries disposa d'algun tipus de tractament efectiu (Figura 2) ^{1,10,11}.

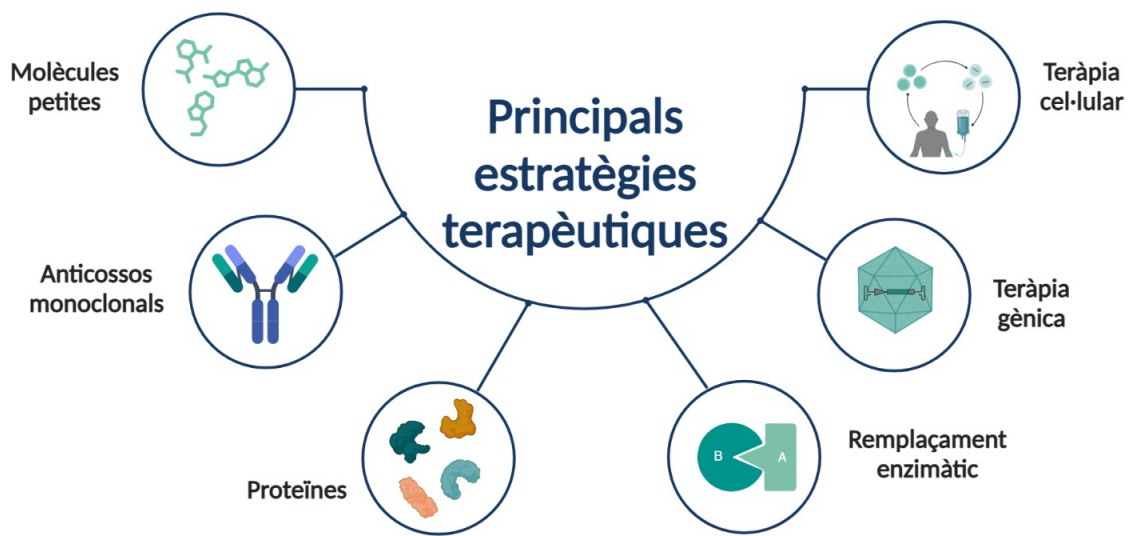


Figura 2. Principals tipus de tractaments utilitzats en malalties minoritàries.

Adaptació de Klimova 2017.

Tot i els avenços en el diagnòstic, la disponibilitat de tractaments efectius, és encara molt limitada, el que fa necessari invertir recursos, i coneixement en el desenvolupament de noves teràpies.

1.2 Errors congènits del metabolisme

Una subcategoria dels trastorns genètics és el grup d' errors congènits del metabolisme. Els errors innats o congènits del metabolisme, són un conjunt de malalties metabòliques hereditàries, d'origen genètic que donen lloc a la interrupció d'una via metabòlica ¹².

El primer error innat del metabolisme (EIM) va ser descrit per Garrod al 1902 ¹³ i actualment s'estima que hi ha més de 700 errors innats del metabolisme ¹⁴. Els errors innats del metabolisme solen anar acompanyats de l'acumulació d'un substrat tòxic de la via metabòlica, una deficiència del producte de la via o una desviació del substrat cap a una via alternativa ¹².

Els errors congènits del metabolisme es poden classificar de diverses maneres, una d'elles es en funció de la mida de les molècules causants del trastorn: malalties de molècules petites i malalties de molècules grans ¹⁵. A més a més, en el cas de les malalties de molècules petites es poden subclassificar en dos tipus: en trastorns d'intoxicació o trastorns de deficiència energètica ¹⁴.

Molts errors congènits del metabolisme presenten símptomes neurològics en el període neonatal, alguns predominantment amb encefalopatia, d'altres amb convulsions neonatals, o d'altres amb hipotonia neonatal, o una combinació de totes ¹².

Degut a aquestes alteracions i que alguns errors innats del metabolisme es poden tractar ¹⁶, molts d'aquest trastorns s'inclouen en programes de cribratge neonatal en diversos països. De fet, el nombre d'EIM tractables continua augmentant i millorant. Un fet important que ha contribuït a facilitar l'atenció en aquest tipus de malalties, ha estat l'augment de l'accés al coneixement sobre els EIM, fent que hi hagi una millora en les eines per al diagnòstic i en els tractaments nutricionals ¹².

1.2.1 Acidúries orgàniques

1.2.1.1 Síntomes clínics

Les acidúries orgàniques són trastorns del metabolisme intermedi en les que hi ha una acumulació característica d'àcids carboxílics. Normalment aquests àcids carboxílics solen ser identificats per l'anàlisi d'orina a través de la cromatografia de gasos/espectroscòpia de masses (CG/EM) ¹².

Durant el període neonatal, les acidúries orgàniques més comuns i rellevants són les que impliquen el metabolisme d'aminoàcids de cadena ramificada com l'acidúria propiònica (AP), acidúria metilmalònica (AMM), acidúria isovalèrica (AIV), i el metabolisme de la lisina/triptòfan, com l'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1). La majoria dels pacients presenten malalties sistèmiques (acidúries orgàniques clàssiques), però algunes afeccions, com l'AG1, tenen principalment anomalies cerebrals.

Les complicacions de les acidúries orgàniques són moltes, que varien des de desmielinització, necrosi estriatal, pancreatitis, dermatosis/epidermòlisi, osteoporosi fins a nefritis (en l'acidúria metilmalònica) o cardiomiopatia (en l'acidúria propiònica) ¹².

Altres acidúries orgàniques que es diagnostiquen mitjançant el perfil d'àcid orgànic en orina són l'acidúria 3-metilglutacònica, les acidúries d-2-hidroxiglutàriques tipus 1 i tipus 2, l'acidúria l-2-hidroxiglutàrica, l'encefalopatia etilmalònica, l'acidúria 2-metil-3-hidroxibutírica, l'acidúria malònica i la malaltia de Canavan o deficiència d'aspartoacilasa ¹².

1.2.1.2 Teràpia

El tractament, en general, a llarg termini inclou la restricció de proteïnes de la dieta i la suplementació amb carnitina. Però en les acidúries orgàniques, pot ser que es donin fases agudes i en aquests moments una ràpida intervenció és primordial. La teràpia en fase aguda normalment comprèn la interrupció de l'estat catabòlic amb infusió de glucosa en dosis altes (amb insulina intravenosa, si cal) i infusió de lípids, per aturar la ingesta de proteïnes durant no més de 24 h. També es contraresta l'acidosi, s'elimina l'amoniac (si cal, amb l'ús d'àcid carglúmic o diàlisi); i es suplementa amb levocarnitina per augmentar l'excreció d'àcid ¹⁷.

L'evolució de les acidúries orgàniques depèn molt del moment del diagnòstic i de la intervenció, així com de la gravetat de la malaltia (en la majoria dels casos, es correlaciona amb el tipus de mutació) ¹².

1.3 Acidúria glutàrica tipus 1

L'acidúria glutàrica tipus I (AG1, MIM #231670; sinònim, acidèmia glutàrica tipus I o deficiència de glutaril-CoA deshidrogenasa) és un error innat del metabolisme que té un patró d'herència autosòmica recessiva i que es va descriure per primera vegada l'any 1975¹⁸. Està causada per mutacions en el gen *GCDH* (MIM # 608801) que codifica per la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH, EC 1.3.99.7). L'enzim GCDH es responsable de la deshidrogenació i descarboxilació del glutaril-CoA en la via catabòlica de la lisina, la hidroxilisina i el triptòfan. Mutacions en el gen *GCDH* generen una deficiència en l'enzim GCDH que provoca una acumulació dels metabòlits àcid glutàric (GA), àcid 3-hidroxi glutàric (3-OHGA) i glutarilcarnitina (C5DC)¹⁹.

És una malaltia minoritària de baixa prevalença i al voltant d'1 de cada 100.000 nounats la pateix en població general, i 1 de cada 250 en poblacions d'alt risc²⁰⁻²³.

1.3.1 Perfil Genètic

Cromosoma 19



El gen *GCDH* humà es troba al cromosoma 19p13.2 (Figura 3), s'expandeix 7Kb i consta d'12 exons i 11 introns. En general, AG1 és una malaltia heterogènia des del punt de vista genètic, amb més de 240 mutacions identificades^{24,25}.

Fins ara s'han informat de més de 210 variants patogèniques del gen de la *GCDH* (confirmades o probables)²⁵. La gran majoria de les quals són mutacions sense sentit; tanmateix, també s'han trobat mutacions d'error de pauta de lectura, variacions intròniques i delecions²⁶⁻²⁹.

Figura 3. Localització del gen *GCDH* al cromosoma 19p13.2.

La majoria de les variants patogèniques de *GCDH* són mutacions *de novo*, però algunes com la mutació p.Arg402Trp, s'han trobat amb una freqüència relativament alta en la població europea. Les variants patogèniques de freqüència alta s'han trobat sobretot en algunes poblacions on hi ha una alta consanguinitat. Com per exemple, habitants de la comunitat Amish del comtat de Lancaster, Pennsilvania, EEUU ^{21,30}, les Primeres Nacions Ojibwe-Cree a Manitoba i Ontario, Canadà ^{31,32}, els Pobles Xhosa sud-africans ²³, els Nadius Americans Lumbee de Carolina del Nord ²⁰ i les Comunitats de Viatgers Irlandesos a la República d'Irlanda ²².

1.3.2 Classificació del pacients en funció del perfil genètic i excretor

Els pacients d'acidúria glutàrica tipus 1 es classifiquen segons la quantitat d'excreció urinària d'àcid glutàric. Es divideixen en dos subgrups: els baixos excretors i els alts excretors ³³.

En els baixos excretors, la concentració d'àcid glutàric excretat en orina és menor a 100 mmol/mol de creatinina i tenen fins a un 30% d'activitat residual de glutaril-CoA deshidrogenasa ^{34,35}. En el cas dels alts excretors, la concentració d'àcid glutàric és major a 100 mmol/mol de creatinina i tenen activitat glutaril-CoA deshidrogenasa nul·la o molt baixa (0%-3%) ³³⁻³⁵ (Taula 2).

Tan els pacients alts excretors com els baixos excretors tenen el mateix risc de lesió estriatal ^{36,37}. Tot i que l'estat de l'excretor no té una correlació clara amb el fenotip clínic en l'etapa infantil, algunes dades suggereixen que els alts excretors tindrien concentracions més altes de GA i 3-OH-GA al sistema nerviós central (SNC) i una major prevalença de patir lesions progressives a la substància blanca ³⁸.

Variants	Canvi nucleotídic	Canvi proteic	Tipus de variant
Variants amb correlació fenotípica	c.91+5G>T		Variant de baix excretor i fundadora en els canadencs de les primeres nacions Ojibway-Cree ^{31,32} .
	c.680G>C	p.Arg227Pro	Variant de baix excretor; 85%-10% d'activitat residual ³⁶ .
	c.1198G>A	p.Val400Met	Variant de baix excretor; 8%-10% d'activitat residual ³⁹ . Una variant habitual entre els baixos excretors a Espanya ³⁵ .
	c.1213A>G	p.Met405Val	Baix excretor. Una variant comuna entre els afroamericans de baix excretor ⁴⁰ .
Variants comunes	c.541G>C	p.Glu181Gln	Variant comuna a Iran i Turquia ⁴¹ .
	c.1204C>T	p.Arg402Trp	Variant patògena més comuna ^{35,42-44} .
Variants fundadores	c.877G>A	p.Ala293Thr	Variant fundadora a la població Xhosa sud-africana; prevalença: aproximada de 1 de cada 5.184 ²³ .
	c.1093G>A	p.Glu365Lys	Variant fundadora a les Comunitats de Viatgers Irlandesos a la República d'Irlanda ²² .
	c.1240G>A	p.Glu414Lys	Variant fundadora del Natiu Americans Lumbee de Carolina del Nord ²⁰ .
	c.1262C>T	p.Ala421Val	Variant fundador dels Amish de Pensilvania. La freqüència portadora pot arribar a ser d'1 de cada 10 en algunes comunitats ^{21,30} .

Taula 2. Variants principals patogèniques de GCDH correlacionades amb el seu fenotip.

Adaptació de Austin 2019.

A Espanya s'han descrit 4 mutacions prevalents repartides en els dos grups de pacients ³⁵:

- p.Arg402Trp i p.Ala293Thr. Sense activitat de GCDH i alta excreció de metabòlits.
- p.Val400Met i p.Arg227Pro. Activitat residual de GCDH i baixa excreció de metabòlits.

1.4 Proteïna glutaril-coA deshidrogenasa (GCDH)

El producte genètic de l'ADN de la GCDH humana és una proteïna precursora de 438 aminoàcids dels quals 44 són residus N-terminal que s'escindeixen a través d'una peptidasa de processament mitocondrial en la importació al mitocondri. La proteïna GCDH madura de 394 aminoàcids es troba a la matriu mitocondrial com a un homo-tetràmer format per subunitats de 43,4 kDa (Figura 4). Cada subunitat inclou una molècula cofactora unida no covalentment al dinucleòtid de flavina i adenina (FAD), que és essencial per a la transferència d'electrons entre el substrat de la GCDH i la flavoproteïna de transferència d'electrons (ETF) ^{25,34,45,46}.

La glutaril-CoA deshidrogenasa és una proteïna, membre de la família de les acil-CoA deshidrogenasa-flavoproteïnes (ACD), que catalitza l'oxidació dels tioèsters d'acil-CoA. Hi ha nou membres coneguts a la família de les ACD, cinc dels quals estan implicats en l'oxidació d'àcids grassos, i quatre, inclosa la GCDH, implicats en l'oxidació d'aminoàcids. La GCDH és única, perquè a més de la reacció de deshidrogenació α,β , comuna a tots els enzims d'aquesta família, la GCDH catalitza la descarboxilació de glutaril-CoA per produir CO₂ i crotonil-CoA ⁴⁶.

A)



B)

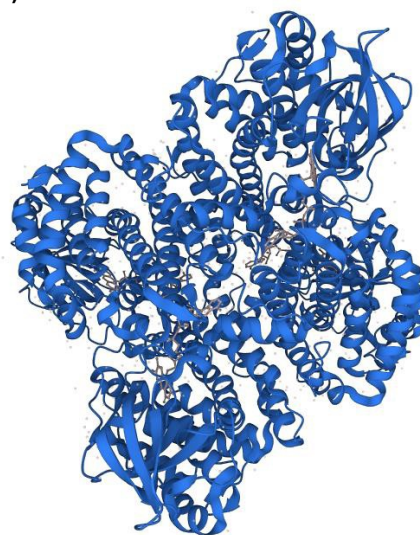


Figura 4. Estructura 3D de la proteïna glutaril-coA deshidrogenasa (GCDH).

A) Estructura 3D monomèrica de la GCDH.

B) Estructura 3D tetramèrica de la GCDH.

Estructura proteica obtinguda de AlphaFold Protein Structure Database ^{46,47}.

1.4.1 Variant patogèniques

Algunes mutacions patogèniques s'expliquen perquè afecten l'estructura, el plegament, l'estabilitat, i, per tant, la formació del complex enzimàtic homo-tetramèric, i pertorben l'arquitectura mitocondrial, i/o la unió al substrat de la proteïna GCDH. Donant lloc a un enzim ineficient/inactiu que resulta en la pèrdua de la funció de la glutaril-CoA deshidrogenasa ²⁹.

Un estudi de Schuurmans ²⁵ va investigar una possible correlació entre el genotip i fenotip de les variants patogèniques de la glutaril-coA deshidrogenasa que afecten a l'acidúria glutàrica tipus 1. El primer que van analitzar va ser si el canvi d'aminoàcids de les variants patogèniques causaven un impacte en els dominis de l'estructura 2D de la proteïna GCDH. En aquest estudi van identificar punts calents on, la freqüència de les variants patogèniques era alta, que es situaven, principalment, en l'exó 11 i l'exó 12, on es localitza el domini funcional de la proteïna. Només van observar tres variants patogèniques situades en la seqüència responsable de dirigir la proteïna al mitocondri. Una hipòtesis que els autors donaven, de perquè hi havia aquesta baixa freqüència de mutacions (Indels, canvis en la pauta de lectura...) en el domini mitocondrial, era que les mutacions en aquest domini poguessin tenir un efecte més nociu. Sent letals en etapes gestacionals o perinatals, i per tant, passant desapercebudes abans que s'hagués pogut fer un diagnòstic genètic o bioquímic.

També varen analitzar com les variants patogèniques afectaven al plegament de la GCDH i per tant, a la seva estructura 3D. Van observar que el lloc actiu i el lloc d'unió al substrat en alguns casos estaven envoltats de posicions on es donaven canvis d'aminoàcids i que es correlacionàvem amb alts excretors.

Finalment van analitzar quin era l'impacte que tenien les substitucions aminoacídiques sobre la funció de la proteïna GCDH. Mostraren que diverses regions centrals i C-terminals de la GCDH, especialment al voltant dels dominis d'unió a FAD i del substrat, eren les regions on hi ha menys tolerància a les mutacions de canvi de aminoàcid.

1.5 Via metabòlica que participa la glutaril-coA deshidrogenasa

La proteïna GCDH és un enzim clau en les vies catabòliques mitocondrials de L-lisina, L-hidroxilisina i L-triptòfan (Figura 5). La degradació de la lisina s'inicia mitjançant la seva deshidrogenació i oxidació per obtenir àcid α -cetoadípic. Després es forma glutaril-CoA a partir de l'oxidació de l'àcid α -cetoadípic amb l'addició de CoA lliure. L'enzim GCDH catalitza la descarboxilació oxidativa de glutaril-CoA a crotonil-CoA. En primer lloc, el que fa és descarboxilar el glutaril-CoA a glutaconil-CoA-CoA seguit d'un pas de deshidrogenació del Glutaconil-CoA-CoA a crotonil-CoA. La GCDH és necessària per a una oxidació completa amb la formació d'acetil-CoA que pot entrar al cicle de Krebs en el catabolisme final de la via ^{48,49}.

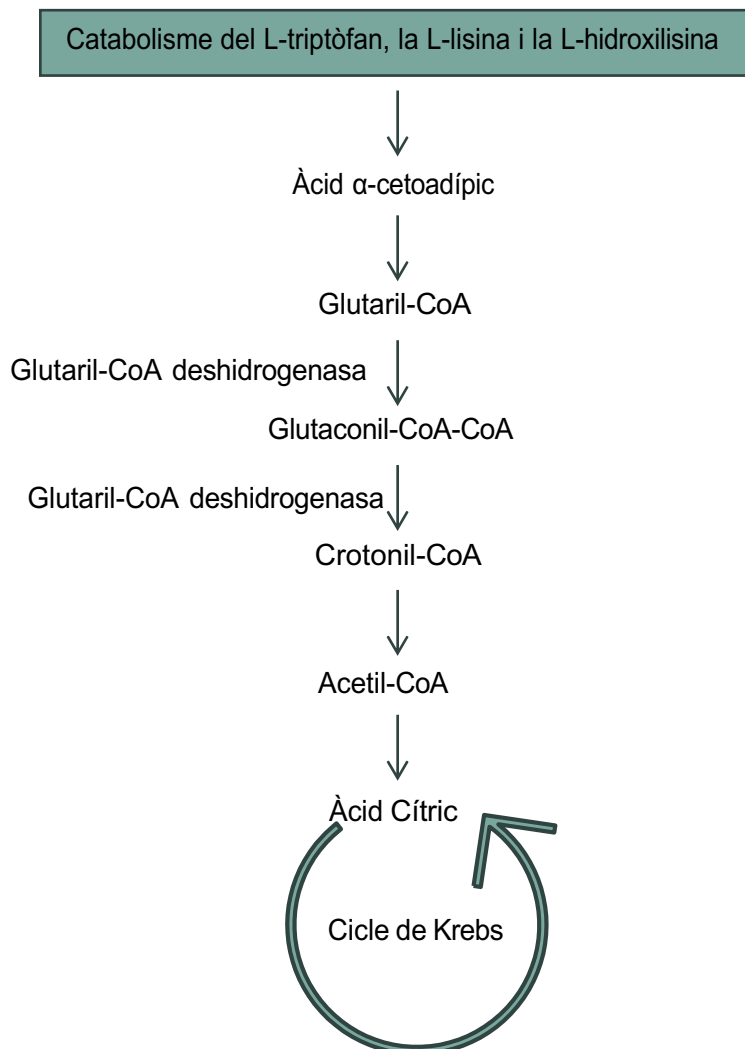


Figura 5. Via catabòlica mitocondrial de la L-lisina, la L-hidroxilisina i el L-triptòfan.

Adaptació de Hernández-Palazón, 2006 ⁵⁰.

1.6 Fisiopatologia

La fisiopatologia de la malaltia s'ha associat fonamentalment al defecte enzimàtic de GCDH que condueix a l'acumulació d'àcid glutàric (GA), d'àcid 3-hidroxiglutaric (3-OHGA) de glutarilcarnitina (C5DC) i d'àcid glutacònic (GCA), i a l'esgotament de carnitina als fluids i teixits corporals. Aquest esgotament és degut a que la carnitina es capaç de conjuguar-se amb el glutaril-CoA per donar lloc a glutarilcarnitina com a mecanisme de detoxificació del cúmul d'àcid glutàric. Ja que sobretot a cervell, un excés dels metabòlits GA i 3-OHGA és neurotòxic (Figura 6) ^{25,35,38,48}.

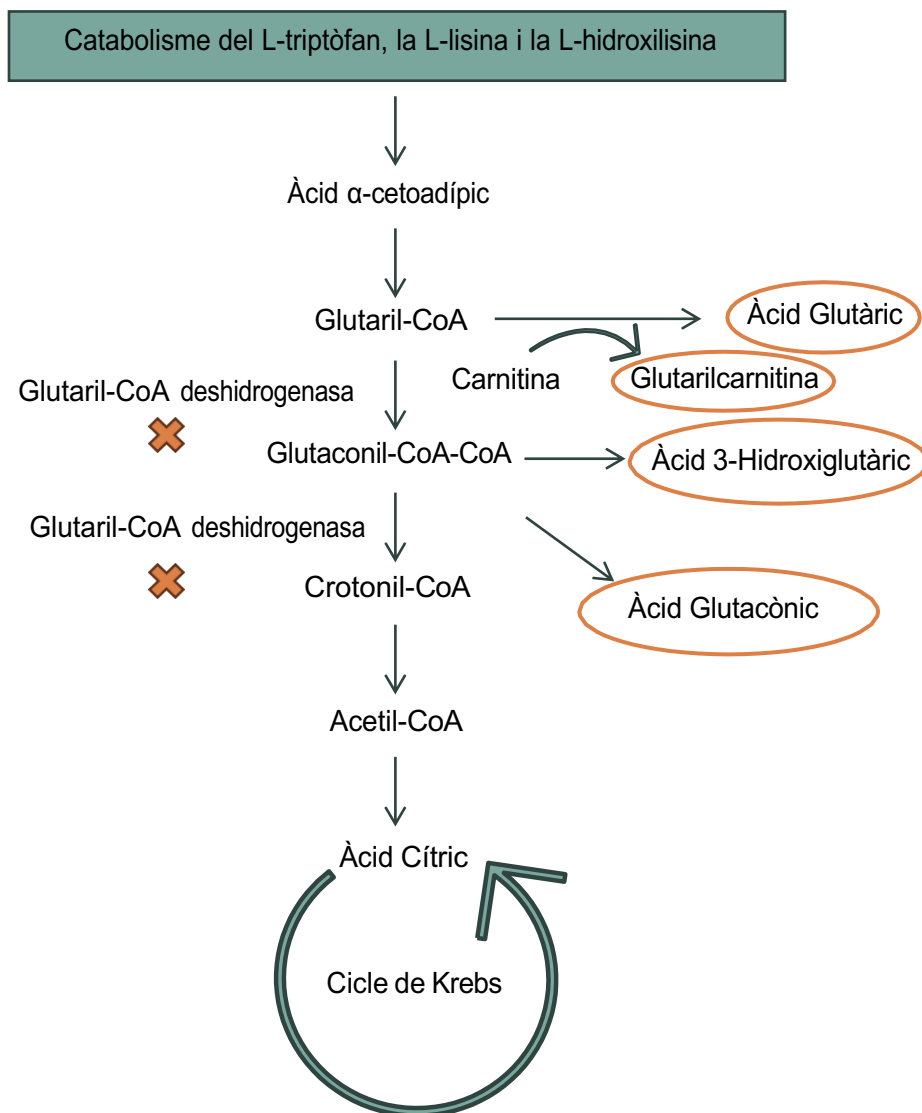


Figura 6. Via catabòlica mitocondrial de la L-lisina, la L-hidroxilisina i el L-triptòfan quan hi ha una deficiència enzimàtica de la glutaril-coA deshidrogenasa.

Adaptació de Hernández-Palazón, 2006 ⁵⁰.

La deficiència de GCDH és un defecte sistèmic; tanmateix, l'acumulació de metabòlits cerebrals, principalment de GA i 3-OHGA, es correlaciona amb la gravetat de la malaltia. De fet, les característiques més greus de l'acidúria glutàrica tipus 1 estan relacionades amb lesions cerebrals ja que les cèl·lules neuronals serien molt susceptibles a l'acumulació d'aquest metabòlits tòxics. S'ha descrit una gliosi abundant i pèrdua neuronal als ganglis basals amb una necrosi important al nucli estriat. La gliosi, en molts casos és una resposta a danys al sistema nerviós central (SNC) i implica la proliferació o hipertròfia de diversos tipus diferents de cèl·lules glials, inclosos els astròcits, la microglia i els oligodendròcits ^{51,52}.

En AG1, l'acumulació de metabòlits neurotòxics es produeix pel metabolisme intracerebral de la lisina importada al cervell. A partir de derivats de la lisina acumulats, glutaril-CoA i glutaconil-CoA-CoA, s'hidrolitzen i es sintetitzen l'àcid glutàric i la glutaril carnitina, i l'àcid 3-hidroxisglutàric i l'àcid glutaconic, respectivament. Aquests metabòlits, un cop produïts dins del cervell, queden atrapats a causa de la limitada permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (BHE) als àcids dicarboxílics, GA, del 3-OHGA i del GCA, i per la baixa capacitat de formar conjugats de carnitina i glicina. Els conjugats de glutaril-CoA amb carnitina s'arriben a formar donant glutarilcarnitina, i aquests tenen la capacitat de creuar la BHE i, per tant, de detoxificar l'acumulació d'àcid glutàric. Així que l'acumulació de GA i 3-OHGA, és el patomecanisme clau per explicar la neuropatologia en pacients amb acidúria glutàrica tipus 1 (Figura 7) ⁵³⁻⁵⁵. Ja que s'ha vist que el GCA té un feble efecte neurotòxic ⁵⁶.

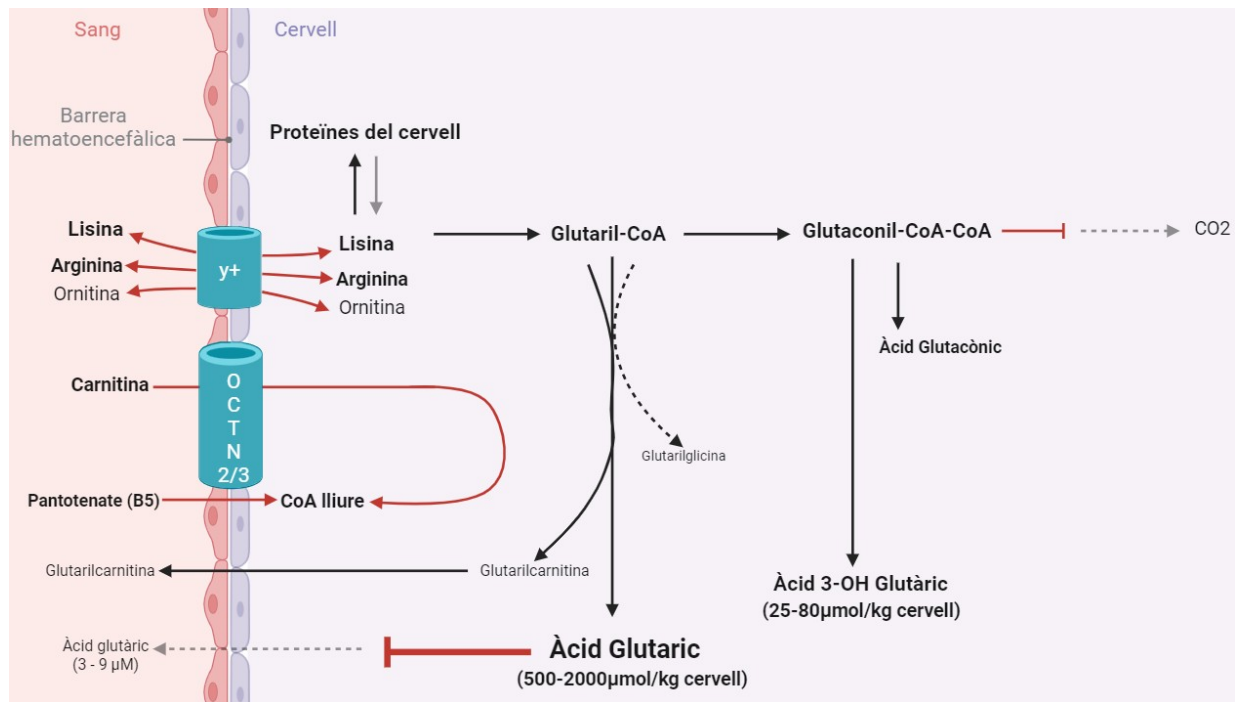


Figura 7. Esquema de l'acumulació dels metabòlits tòxics, àcid glutàric (GA), àcid 3-hidroxi glutàric (3-OHGA) i glutarilcarnitina (C5DC) al cervell.

Adaptació de Strauss, 2011. La lisina, l'arginina i l'ornitina travessen la barrera hematoencefàlica mitjançant un transportador facilitador bidireccional comú (y+). L'arginina exerceix una competència important en el transport de lisina. La lisina intracerebral es pot utilitzar per a la síntesis de noves proteïnes o es pot degradar als mitocondris. En individus amb deficiència de GCDH, el glutaril-CoA no degradat, com a conseqüència de l'alteració de la via catabòlica de la lisina, esdevé glutarilcarnitina, àcid glutàric i àcid 3-hidroxi glutàric. Com que no hi ha sistemes de transport cerebrovasculars d'alta afinitat per a aquests àcids orgànics, s'acumulen en concentracions elevades en el teixit cerebral (de 2 a 3 ordres de magnitud superior a la concentració en plasma o en líquid cefalorraquídi en condicions basals). La L-carnitina entra al cervell mitjançant un sistema de transport separat (OCTN2/3) i es pot utilitzar de manera limitada per formar glutarilcarnitina. La conjugació amb glicina és insignificant.

Les raons per les quals hi ha una afectació preferentment a l'estriat i per què hi ha un període de vulnerabilitat estriatal augmentada en la infància segueix essent desconegut ⁵⁵.

1.7 Descripció clínica

La simptomatologia de l'acidúria glutàrica tipus 1, quan no és tractada, té dues presentacions principals: una forma més comuna, de debut infantil; o una forma menys comuna, d'aparició tardana (posterior als 6 anys). El fenotip de l'acidúria glutàrica tipus 1 pot variar àmpliament entre pacients amb un mateix genotip i està molt relacionat amb l'edat en què es va produir la primera crisi encefalopàtica aguda. Si aquesta apareix entre els tres mesos i tres anys d'edat, el pacient desenvoluparà la malaltia de debut infantil. Mentre que si la crisi no succeeix després de l'edat de sis anys, es considerarà d'aparició tardana ^{57,58}.

A més a més, dins de la malaltia es poden observar dos tipus de pacients, els que tenen un debut agut de distonia després d'una crisi encefalopàtica aguda precipitada per estats catabòlics (per exemple, malaltia febril, vòmits/diarrea, períodes de dejuni preoperatori). O un debut insidiós del trastorn del moviment sense cap esdeveniment agut causant aparent. Encara que es creu que aquest debut es degut a que l'esdeveniment agut succeeix en un període perinatal ^{59,60}.

De manera característica, aquestes crisis donen lloc a una lesió estriatal bilateral aguda i posteriors trastorns complexos del moviment. Tanmateix, tot i no haver patit una crisi encefalopàtica aguda alguns pacients també poden desenvolupar una lesió dels ganglis basals⁵⁵.

També s'han observat manifestacions de malaltia no neurològiques independentment de l'edat d'inici, com és la malaltia renal crònica. Aquesta pot ocórrer en persones amb acidúria glutàrica tipus 1, fins i tot que han tingut adhesió al tractament ^{61,62}.

1.7.1 Acidúria glutàrica tipus 1 debut infantil.

En absència de tractament, entre el 80% i el 90% dels nens amb acidúria glutàrica tipus 1 de debut infantil experimentaran una crisi encefalopàtica aguda. El 95% de les quals es produeixen en els primers 24 mesos de vida. Aquestes crisis es poden precipitar per febre, infeccions, reaccions febrils a les vacunacions, per estressants catabòlics o per dejuni associats a l'anestèsia i procediments quirúrgics ^{37,38}. El resultat després d'aquestes crisis agudes en pacients, es una alta discapacitat i mortalitat ^{37,63}.

Altres manifestacions que s'observen en els pacients d'acidúria glutàrica tipus 1 de debut infantil són les hemorràgies subdural, la macrocefàlia, espasmes i convulsions que poden acompanyar la crisi encefalopàtica aguda o, en alguns casos, poden ser la manifestació de presentació d'aquesta ⁵⁵.

Amb el diagnòstic precoç i l'adhesió al tractament, el 80%-90% dels individus amb acidúria glutàrica tipus 1 romanen en gran part asimptomàtics, reduint la incidència de crisis encefalopàtiques agudes i prevenint el deteriorament neurològic progressiu. Quan, en canvi, es diagnostica després de l'aparició de manifestacions neurològiques, l'efecte terapèutic de les intervencions habituals és més limitat ⁵⁵.

Les persones que s'adhereixen als tractaments de manteniment i d'emergència, rarament desenvolupen distonia, els trastorns del moviment que pateixen són menys greus i les lesions menys extenses. Mentre que els que no tenen una bona adherència al tractament, tenen un alt risc de desenvolupar un trastorn del moviment ^{53,59,64-66}.

L'esperança de vida dels pacients és molt variable, hi ha pacients amb dany neurològic greu que han arribat a l'edat adulta, però aproximadament la meitat moren durant la primera dècada de vida en el transcurs d'un episodi agut⁶³ Amb el diagnòstic i el tractament adequats, es disminueix el risc de patir crisis encefalopàtiques i la mortalitat en la primera dècada de la vida³⁸.

1.7.2 L'acidúria glutàrica d'aparició tardana.

L'acidúria glutàrica d'aparició tardana es defineix com l'inici de les manifestacions clíniques després dels sis anys i solen ser de fenotip d'alta excreció. En els pacients d'aparició tardana la simptomatologia pot ser molt variada, des de pacients asimptomàtics fins a pacients que pateixen una varietat de patologies neurològiques. Alguns d'aquest símptomes que s'observen són: mals de cap crònics, macrocefàlia, epilèpsia, tremolors i demència. En la ressonància magnètica s'hi pot observar també hipoplàsia frontotemporal, alteracions en la substància blanca, neuropatia perifèrica, neoplàsies cerebrals i nòduls subependimals ^{38,55}.

1.8 Mètodes de diagnòstic

El cribatge neonatal de l'acidúria glutàrica tipus 1 s'està implementant en un nombre creixent de països d'arreu del món, i Espanya es un dels països que la té inclosa com a obligatòria en els programes de detecció neonatal de les diferents comunitats autònomes (Consultat a la web del Ministeri de Sanitat Espanya). L'anàlisi de l'acidúria glutàrica tipus 1, consisteix en analitzar els nivells de glutarilcarnitina (C5DC) en taques de sang seca en la prova del taló dels recent nascuts⁵⁹.

En el cas de que la prova doni nivells alts de glutarilcarnitina, es procedeix al 'anàlisi bioquímica en orina i/o plasma dels nivells de metabòlits àcid glutàric i àcid 3-hidroxiglutàric per cromatografia de gasos, espectrometria de masses i/o espectrometria de masses en tàndem. I es fa un estudi de confirmació mitjançant la identificació de variants patogèniques en GCDH. Tot i així, el diagnòstic definitiu s'estableix mesurant l'activitat de GCDH en cultius de fibroblasts o de leucòcits²⁵.

Si no hi ha un diagnòstic mitjançant el cribatge neonatal, es té en compte la patologia clínica i les troballes neuroradiològiques. El diagnòstic es confirma mitjançant una anàlisi genètica o mesurant els nivells de GA, 3-OHGA, i C5DC en una anàlisi quantitativa d'àcids orgànics en orina⁵⁵.

1.8.1 Consell Genètic

En aquest tipus de malalties genètiques es sol oferir l'assessorament genètic per tal de proporcionar a les persones i famílies informació sobre la naturalesa de la malaltia, els modes d'herència i les implicacions dels trastorns genètics que els permetin prendre decisions mèdiques i personals.

Com que l'acidúria glutàrica tipus 1 s'hereta de manera autosòmica recessiva, els pares d'un individu afectat són heterozigots obligats (és a dir, portadors d'una variant patogènica de GCDH). Els heterozigots (portadors) són asimptomàtics i no tenen risc de desenvolupar característiques clíniques del trastorn⁵⁵.

En el moment de la concepció, cada germà d'un individu afectat té un 25% de possibilitats de ser afectat, un 50% de ser portador asimptomàtic i un 25% de no estar afectat i no ser portador. En el cas de ser portador, tret que la parella reproductiva del individu també tingui acidúria glutàrica tipus 1 o sigui portadora, la descendència serà heterozigot (portador) d'una variant patogènica de GCDH en el 50% dels casos. A més a més, altres membres de la família poden ser portadors de la mateixa variant patogènica. Cada germà dels pares del pacient té un risc del 50% de ser portador d'una variant patogènica de GCDH.

Es important conèixer les variants patogèniques en una família per tal de poder oferir proves prenatales, proves genètiques preimplantacionals i un correcte assessorament genètic ⁵⁵.

1.9 Tractament

El desenvolupament i l'avaluació dels plans de tractament, la formació i l'educació de les persones afectades i les seves famílies, i l'evitació dels efectes secundaris del tractament dietètic, com la desnutrició o els problemes de creixement, requereixen un enfocament multidisciplinari. El pronòstic del pacient depèn d'un diagnòstic oportú i d'una gestió i tractament conseqüents ⁵⁵.

L'AG1 es considera un trastorn neurometabòlic tractable ⁶⁷ i quan hi ha sospita d'acidúria glutàrica tipus 1 durant l'avaluació diagnòstica (és a dir, a causa d'una concentració elevada de C5DC, GA o 3-OH-GA en plasma o orina), s'ha d'iniciar immediatament el tractament metabòlic.

Els principis del tractament són reduir l'oxidació de la lisina i millorar la desintoxicació fisiològica del glutaril-CoA. La teràpia metabòlica combinada inclou el següent (Taula 3): ^(38,65-69)

- Dieta baixa en lisina i triptòfan.
- Suplementació de carnitina i aminoàcids.
- Tractament d'emergència durant els episodis aguts. L'objectiu es evitar el catabolisme i minimitzar l'exposició de lisina al sistema nerviós central i els seus subproductes metabòlics tòxics durant una crisi. En un servei d'urgències, s'inicia la rehidratació i aportació de glucosa, se suspèn durant un màxim 1-2 dies l'aportació de proteïnes naturals, es manté la fórmula específica per a AG1 i dobla la dosi de carnitina en funció de la tolerància del pacient.

Edat	0-6 Mesos	7-12 Mesos	12-47 Mesos	48-72 Mesos	>6 anys
L-lisina (proteïna natural) mg/kg/dia	100	90	60-80	50-60	Ingesta controlada de proteïnes amb proteïnes naturals i evitant aliments rics en lisina.
Formula específica per a AG1 sense lisina i amb el triptòfan reduït g/kg/dia	0,8-1,3	0,8-1,0	0,8	0,8	Generalment no hi ha recomanacions de seguir prenent la formula.
Energia kcal/kg/dia	80-100	80	81-94	63-86	Requisits normals per edat i pes.
L-carnitina mg/kg/dia	100	100	100	50-100	30-50

Taula 3. Requeriments nutricionals per a L-lisina, L-carnitina, calories i proteïnes naturals per a pacients amb acidúria glutàrica tipus 1.

Adaptació de Austin 2019.

El tractament dietètic i el tractament intens d'emergència han reduït la freqüència de les crisis encefalopàtiques agudes i els trastorns del moviment al 10%-20% ⁵⁵.

Per tal d'evitar els episodis aguts, als pacients se'ls recomana evitar que hi hagi un excés de proteïna dietètica o desnutrició proteica, el dejuni prolongat, infeccions, febres o una aportació calòrica inadequada, ja que això induiria a un estat catabòlic on es consumiria lisina i hi hauria un augment dels metabòlits tòxics ⁵⁵.

Malgrat tots els esforços realitzats per a la detecció precoç i en el tractament dietètic, alguns pacients encara desenvolupen crisis encefalopàtiques ⁷⁰ i es mantenen amb dèficits motors i lingüístics, tot i mantenir una bona adherència a la dieta ⁷¹.

Per tant, cal investigar noves opcions terapèutiques, encara que actualment, no existeixen noves teràpies que estiguin en assaigs clínics ni als Estats Units ni a Europa ^{72,73}.

1.10 Models

En el camp de la recerca biomèdica, l'ús de models animals i cel·lulars ha esdevingut una eina imprescindible per aprofundir en la comprensió dels mecanismes subjacents de moltes malalties. En el cas de l'acidúria glutàrica tipus 1, s'ha treballat amb els dos tipus de models i les investigacions, utilitzant aquests models, han estat fonamentals per avaluar l'eficàcia de tractaments potencials i esbrinar els processos biològics clau involucrats en el desenvolupament i la progressió de la malaltia.

1.10.1 Models cel·lulars

En l'estudi de l'acidúria glutàrica tipus 1, podem trobar tres tipus principals de models cel·lulars: els cultius de cèl·lules aïllades de pacient, els estudis amb línies cel·lulars i els cultius cel·lulars derivats de models animals.

En els cultius cel·lulars de cèl·lules derivades de pacients, s'han utilitzat principalment fibroblasts. Amb aquests fibroblast s'han realitzat estudis de correlació genotip-fenotip de variants bial·lèliques del gen GCDH ⁷⁴ on es va demostrar una correlació inversa entre l'activitat enzimàtica residual i la concentració urinària d'àcid glutàric i àcid 3-hidroxiglutàric, i van predir que la quantitat de proteïna no es correlacionava amb l'activitat de l'enzim. Van arribar a la conclusió que la integració de diferents fonts de dades ajuda a predir el complex fenotip clínic en individus amb AG1.

En altres estudis amb fibroblast, es van identificar noves mutacions, com la c.1147C > A (p.Arg383Ser) en la població iraniana ⁷⁵. O es van utilitzar per analitzar els efectes preventius de la L-carnitina davant el dany oxidatiu ⁷⁶. Aquests estudis van demostrar que la suplementació amb L-carnitina aportava efectes beneficiosos, que no només es devien a l'augment de l'excreció de metabòlits tòxics acumulats, sinó també a la prevenció del dany oxidatiu ja que millorava la capacitat antioxidant.

Dins el grup de línies cel·lulars destaquem alguns estudis, que han generat cèl·lules amb pèrdua funcional del enzim GCDH. Aquest és el cas del model generat pel nostre grup en que la línia de neuroblastoma SH-SY5Y, s'ha modificat genèticament per obtenir un model humà de neurones deficients en GCDH, SH-SY5Y-GCDH. Hem observat que aquestes cèl·lules presenten una alta susceptibilitat a la neurotoxicitat i a l'estrès oxidatiu després d'una exposició alta en lisina ⁷⁷.

Un altre línia utilitzada com a model d'estudi, són les cèl·lules HEK293, les quals s'han fet servir per dur a terme anàlisis d'expressió proteica de 4 mutacions sense sentit, c.412A > G (p.Arg138Gly), c.787A > G (p.Met263Val), c.1204C > T (p.Arg402Trp) i c.1240G > A (p.Glu414Lys), mostrant que la reducció de l'estabilitat intramitocondrial de les variants mutades, degut a la inactivitat enzimàtica, la reducció de l'expressió de GCDH, la ràpida degradació i el deteriorament en la formació de l'homo-tetràmer de la proteïna, serien els responsables de l'AG1 ⁷⁸.

Les cèl·lules HEK293 també s'han utilitzat per a l'estudi de possibles estratègies terapèutiques generant models de doble knock-out (KO) per al gen de la GCDH i per a un altre gen de la via catabòlica de la lisina ^{79,80}. Alguns exemples són l'estudi de doble knock-out sobre la semialdehid sintasa 2-aminoadípica (AASS), el primer enzim de la via catabòlica de la GCDH, i al GCDH. on es va observar que la pèrdua de la funció AASS condueix a una reducció d'aproximadament cinc vegades els nivells de glutarilcarnitina, suggerint que la inhibició farmacològica de l'AASS pot representar una estratègia atractiva per tractar l'AG1 ⁸⁰. L'estratègia de doble knock-out sobre DHTKD1, un altre enzim anterior en la via catabòlica de la GCDH i la GCDH va mostrar una disminució de dues vegades els nivells de glutarilcarnitina, però va revelar l'existència d'una font enzimàtica alternativa de glutaril-CoA a través de la oxoglutarat deshidrogenasa (OGDH) ⁷⁹.

Les cèl·lules BHK (Cèl·lules de ronyó de hamster baby) son un altre model dels models emprats. En elles s'han realitzat estudis sobre els efectes moleculars i metabòlics de la interacció de la GCDH amb proteïnes de la matriu mitocondrial identificant a la dihidrolipoamida S-succiniltransferasa (DLST), implicada en la formació de glutaril-CoA, i la subunitat β de la flavoproteïna de transferència d'electrons (ETFB), que serveix com a acceptor d'electrons, com a proteïnes que s'uneixen a GCDH ⁸¹.

Recentment, també s'ha proposat l'ús de iPSC humaes amb la supressió isogènica de GCDH com a model a partir del qual es podrien diferenciar subtipus cel·lulars deficients en GCDH ⁸².

El model cel·lular més comú, però, que s'ha utilitzat per estudiar l'acidúria glutàrica tipus1, són cèl·lules derivades de models animals de l'AG1. Com que l'òrgan majoritàriament afectat en aquesta patologia és el nucli estriat, la gran majoria d'estudis s'han realitzat en neurones primàries estriatals i astròcits derivats de rates i ratolins knock-out per a la GCDH. En aquests models s'han estudiat els efectes sobre el deteriorament del metabolisme energètic i la degeneració estriatal, observant-se que l'àcid glutàric provocaria danys neuronals induint apoptosi com a resultat de l'activació de receptors NMDA en neurones estriatals ⁸³. En canvi, segons Freudenberg el 3-OHGA no participaria en l'activació de mecanismes excitotòxics ⁸⁴. Tanmateix, estudis en neurones primàries d'embrió de pollastre han demostrat que el 3-OHGA estaria implicat en la desregulació de l'homeòstasi cel·lular que acabaria desencadenant dany cel·lular ⁸⁵.

Aquests models també han estat útils per a l'estudi de potencials teràpies. Així, en un estudi en neurones primàries estriatals, es va observar que la suplementació d'arginina i homoarginina frenava la susceptibilitat a l'apoptosi que aquestes cèl·lules tenien en absència de GCDH ⁸⁶ i millorava el metabolisme energètic incrementant els nivells d'ATP i NADH ⁸⁷.

Els astròcits són també un tipus cel·lular molt afectat en AG1. Els estudis en astròcits cultivats procedents de models de ratolí en AG1 han demostrat que presenten una major susceptibilitat a l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial, que acabaria provocant la mort cel·lular i es podria relacionar amb la leucodistrofia cortical observada en pacients amb AG1 ⁸⁸.

El tercer gran grup d'estudis en models cel·lulars derivats de models animals per a l'AG1 és el que estudia aspectes relacionats amb la interacció neurona – astròcit. En aquestes investigacions es mostra que concentracions patològicament rellevants de GA, alteren la comunicació metabòlica entre neurones i astròcits, conduint a la mort dels astròcits ⁸⁹ i les neurones. Els propis astròcits acumularien GA i 3-OHGA el que generaria un efecte amplificador de la toxicitat que impactaria sobre les neurones. Aquest efecte sobre la supervivència cel·lular s'ha relacionat amb un mecanisme dependent de l'estrès oxidatiu ⁹⁰ i com a resultat de la interrupció de l'activitat del cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA) ⁹¹.

Amb l'objectiu de disposar de models ex-vivo que recapitulin millor els processos *in vivo*, s'han generat models cel·lulars 3D a partir de models animals per a l'AG1, basats en l'establiment de cultius organotípics de rata i ratolí. Els resultats d'aquests treballs demostraven que seria l'acumulació de 3-OHGA el que provocaria la mort dels astròcits i es generaria una acumulació intracerebral d'amoni que desencadenaria la mort secundària d'altres cèl·lules cerebrals ^{92,93}.

1.10.2 Models animals

El primer model animal que es va desenvolupar per a l'acidúria glutàrica tipus 1 va ser un model knock-out de ratolí per la GCDH, *Gcdh*^{tm1Dmk (-/-)} o *Gcdh* *-/-*, model que hem utilitzat en el desenvolupament d'aquest treball ⁵¹. Els ratolins *Gcdh* *-/-* eren viables i no presentaven diferències aparents respecte els ratolins de tipus salvatge. Els ratolins mutants tenien un fenotip bioquímic molt similar als pacients humans amb acidúria glutàrica tipus 1, incloent nivells elevats d'àcid glutàric i d'àcid 3-OH-glutàric en orina i cervell, i alts nivells de C5DC en sèrum, i una mielopatia espongiforme difusa. Tanmateix, aquest animals no presentaven el complex fenotip clínic dels pacients amb AG1. En aquest estudi preliminar, els ratolins *Gcdh* *-/-*, presentaven únicament un dèficit motor lleu.

Principalment els estudis amb acidúria glutàrica s'han realitzat amb el model de ratolí *Gcdh*^{tm1Dmk (-/-)} ^{48,51,100–103,54,79,94–99}, però també hi ha hagut grups que han generat altres models knock-outs per a la GCDH en altres backgrounds genètics. Com els C129SvEv ^{104–112}, els C57BL/6CrI × 129/SvCrI ¹¹³, els 1295vEv ¹¹⁴, els C6CBA ¹¹⁵ o els C57BL/6J/TIRF ¹¹⁶.

Estudis posteriors han mostrat que el fenotip de tots els models de ratolins *Gcdh* *-/-* s'agreuja quan els animals s'exposen a una dieta rica en lisina. La sobrecàrrega de lisina a la dieta provoca una crisi metabòlica que cursa amb una alteració significativa dels paràmetres bioquímics en teixits, plasma i orina, i es desenvolupen signes notables de neurodegeneració estriatal. El model mostra una susceptibilitat a lesions cerebrals depenent de l'edat ⁹⁶, similar a la condició humana, amb una forta letalitat quan els animals s'alimenten amb una dieta alta lisina en el període de deslletament. Presenten una mortalitat del 60% als 5 dies post dieta ^{48,95,98}. Aquests estudis van revelar que la susceptibilitat a desenvolupar el fenotip complet de la malaltia està directament relacionada amb el catabolisme de la lisina i una capacitat augmentada de captació d'aquesta en el cervells immadurs.

La fisiopatologia subjacent a les alteracions neuropatològiques observada en AG1, encara no és del tot coneguda, tot i que estudis en el model (*Gcdh* *-/-*) han contribuït a identificar alguns dels mecanismes subjacents. Els animals que sobreviuen, a la sobrecàrrega de lisina, presenten alteracions neuropatològiques greus, amb pèrdua neuronal, vacuolització en les capes de mielina o àrees adjacents i en alguns casos hemorràgies intraventriculars, lesions estriatals i en substància blanca ^{90,95,98,99,103–105,108,113,114}. També presenten alteracions en l'homeòstasi redox, la inflamació, la biogènesi i la dinàmica mitocondrial ^{94,100,102,105–107,109,110}, disfunció vascular i de la barrera hematoencefàlica ^{54,117} i afectacions renals ⁹⁷(Figura 8).

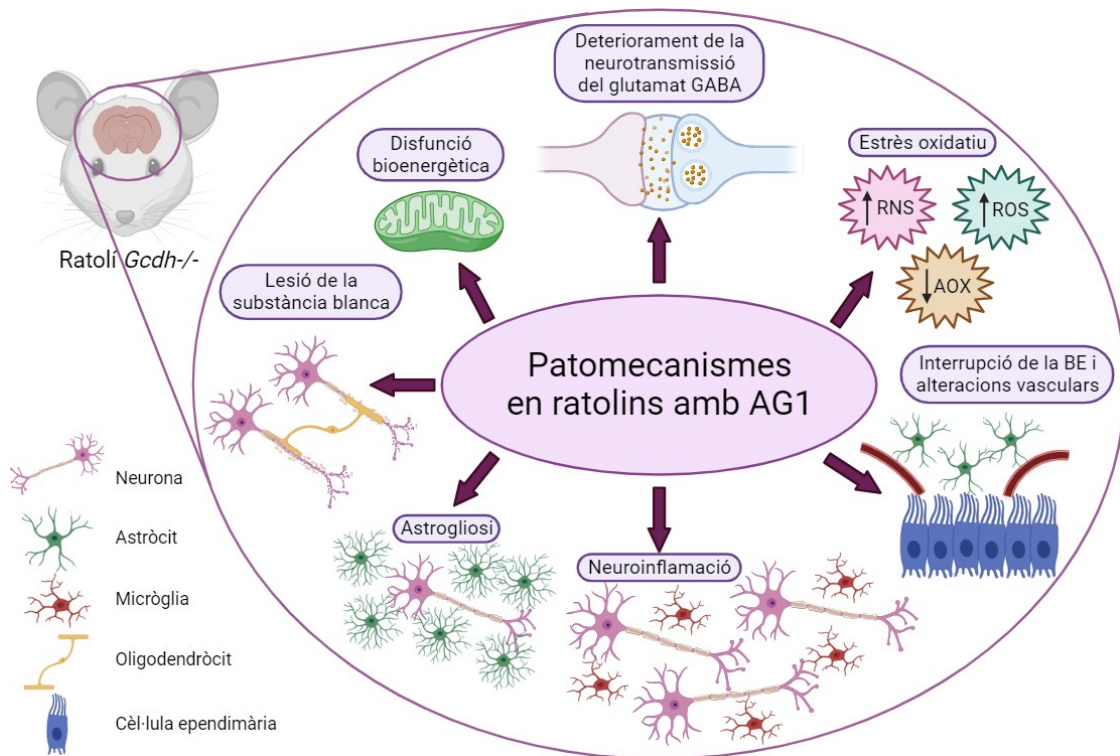


Figura 8. Representació esquemàtica dels mecanismes implicats en la patologia cerebral dels ratolins *Gcdh*^{-/-}.

Adaptació de Wajner, 2019. Les principals alteracions neurològiques observades en ratolins *Gcdh*^{-/-} són: estrès oxidatiu, neuroinflamació, disfunció de la bioenergètica mitocondrial, deteriorament de la neurotransmissió glutamatèrgica i gabaèrgica, astroglíosi, anomalies vasculars, alteració de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica i lesió de la substància blanca.

Els estudis en ratolins també han permès abordar el potencial de noves estratègies terapèutiques. Així per exemple s'ha vist que ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a una dieta baixa en lisina i alta en glucosa, i s'observà una reducció en l'acumulació de metabòlits neurotòxics al cervell^{96,101}. Aquests resultats van ser claus per proposar en els tractaments d'emergència als pacients l'administració de glucosa. En un altre estudi en que també s'utilitzava dieta baixa en lisina però en combinació amb L-carnitina es va observar que en aquestes condicions a més a més de donar-se una reducció en l'acumulació dels metabòlits neurotòxics, hi havia un efecte de prevenció de l'estrès oxidatiu¹¹¹. Donar el suplement de carnitina als pacients ha permès reduir notablement la freqüència dels episodis encefalopàtics aguts i per tant la mortalitat en pacients⁶⁹.

Altres estudis realitzats amb el mode, de ratolí de AG1 van mostrar que l'administració d'heparan sulfat 2 dies després d'una crisi metabòlica podia millorar la lesió cerebral en ratolins AG1 ¹¹⁵. O que la reducció del substrat mitjançant la inhibició de la semialdehid sintasa 2-aminoadípica (AASS), el primer enzim en la via catabòlica de la glutaril-CoA deshidrogenasa, conduïa a una disminució en els nivells d'àcid glutàric i d'àcid 3-hidroxiglutaric en orina, plasma, cervell i fetge. Donant suport a la idea que la inhibició farmacològica de l'AASS podria representar una estratègia atractiva per tractar l'acidúria glutàrica tipus 1 ⁸⁰.

El treball més recent que planteja l'estudi de noves teràpies per a l'acidúria glutàrica tipus 1 en models de ratolí *Gcdh* ^{-/-}, ha estat la publicació de Barzi ¹¹⁶. En aquest treball plantegen diferents aproximacions de teràpia dirigida a fetge per tal de rescatar el fenotip en el ratolí. Proposen el trasplantament d'hepatòcits de ratolins *Gcdh* ^{+/+} a ratolins AG1, evitar la metabolització de la lisina per la via clàssica amb un knock-out l'AASS i l'aplicació d'una teràpia gènica dirigida a fetge, amb l'ús d'un virus adenoassociat que expressa el gen de la GCDH sota un promotor específic de fetge. Amb totes tres estratègies demostren aconseguir una reducció dels nivells de metabòlits tòxics al cervell i una millora en la supervivència.

Un altre model animal que s'ha utilitzat en l'estudi de l'acidúria glutàrica tipus 1, ha estat la rata. En els primers estudis realitzats amb aquest model, es va treballar amb rates Wistar *Gcdh* ^{+/+}, demostrant inducció de l'estrès oxidatiu del àcid glutàric ¹¹⁸ i àcid 3-hidroxiglutaric ¹¹⁹ en estriat, i en conseqüència els efectes sobre la inflamació i el deteriorament de la memòria ¹²⁰.

En una altra soca de rata, les Sprague–Dawley, es va estudiar el patró d'expressió espai-temporal de la GCDH en cervells i òrgans perifèrics durant el desenvolupament embrionari i l'edat adulta. Observant-se que durant el desenvolupament embrionari, la GCDH s'expressava predominantment a les neurones del sistema nerviós central i perifèric, la qual cosa implicava un paper important per al desenvolupament del cervell. I en les rates adultes van determinar una forta expressió al fetge, en neurones de diferents regions del cervell, en els túbuls proximals renals, en la mucosa intestinal i en els nervis perifèrics. Aquest patró d'expressió correlacionaria en part amb l'evolució del fenotip en pacients amb AG1 ¹²¹.

Recentment i també en rates Sprague–Dawley, s'ha desenvolupat el primer model en rata d'acidúria glutàrica tipus I. Es tracta d'un ratolí *knock-in* que incorpora al gen *Gcdh* la mutació p.Arg411Trp, l'homòleg de la seqüència de la mutació en el gen humà p.Arg402Trp, ¹²². Les rates homozigotes *Gcdh ki/ki* van revelar un fenotip excretor elevat, però igual que en el model de ratolí *Gcdh -/-*, va ser necessària l'exposició a una dieta alta en lisina per donar lloc a signes clínics i bioquímics. En els cervells d'aquestes rates es van observar trets patològics com, l'esgotament de la carnitina lliure, l'activació de micròglia, l'astroglíosis, la mort astrocítica per apoptosi, l'augment del nombre de vacuoles, les activitats OXPHOS deteriorades i dany neuronal. En un estudi posterior amb aquestes rates *Gcdh ki/ki*, es va determinar l'efecte crònic de la deficiència de GCDH sobre la funció renal, i es van observar danys renals aguts i crònics ¹²³.

1.11 Teràpia gènica

La teràpia gènica, una disciplina innovadora en el camp de la medicina molecular, s'ha posicionat com una promesa extraordinària per afrontar una àmplia gamma de malalties genètiques i adquirides. Aquesta teràpia, que busca corregir o mitigar alteracions genètiques específiques a nivell molecular, ha avançat de manera accelerada en les últimes dues dècades i ha generat un interès creixent entre la comunitat científica, els professionals de la salut i els pacients.

La teràpia gènica consisteix en l'ús d'àcids nucleics (ADN o ARN) pel tractament de trastorns humans. Depenent del tipus de malaltia, això es pot aconseguir mitjançant el lliurament d'un gen terapèutic per proporcionar la funció que falta del gen defectuós, o reduint els nivells d'un producte genètic nociu. Aquesta estratègia terapèutica utilitza diverses eines sofisticades per dur a terme la seva funció, com ara oligonucleòtids, vectors virals i no virals.

1.11.1 Evolució històrica

El terme "enginyeria genètica" es va utilitzar per primera vegada a la dècada de 1930 però no va ser fins la dècada de 1960 que es van descobrir els principis bàsics de la transferència de gens en bacteris (Figura 9). Aquests principis es van adaptar al desenvolupament de noves tècniques de transfecció en eucariotes, per tal de poder acabar sent utilitzats en humans ¹²⁴. Una dècada més tard, es van descriure per primera vegada els enzims de restricció, nucleases que tallen el DNA, i les DNA lligases que en permeten el lligament, eines que avui formen part de la base de la manipulació gènica. Amb aquestes tècniques i el descobriment de la capacitat dels virus per transferir material genètic, es van donar els primers passos per introduir gens terapèutics, com a part del genoma de virus, generant el que coneixem com a vectors virals. Aquests avenços tecnològics van permetre crear vectors de teràpia gènica capaços de transferir material genètic específic a cèl·lules diana ^{125,126}.

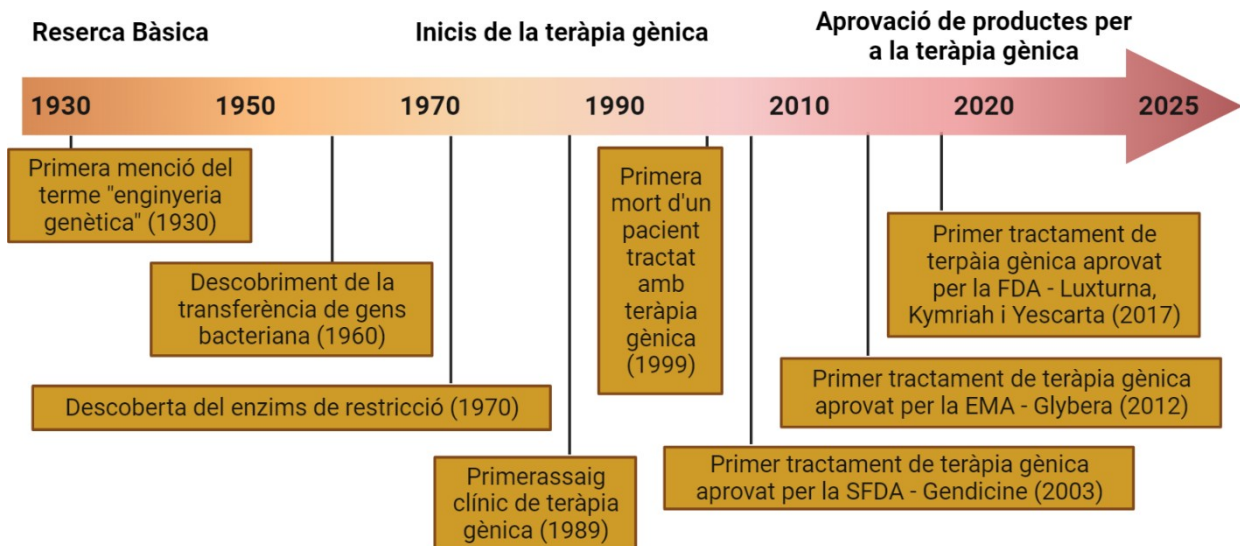


Figura 9. Cronologia històrica de la teràpia gènica.

Adaptació de Arabi, 2022.

Els primers assajos de transferència gènica en humans van tenir lloc el 1989, es va utilitzar per primera vegada un vector retroviral que contenia el gen de la neomicina i que permetia rastrejar limfòcits, infiltrats en la immunoteràpia per al melanoma ¹²⁷. Aquest primer estudi va permetre demostrar la viabilitat i seguretat de l'estratègia i va obrir les portes als primers assajos de teràpia gènica en pacients. L'any 1990 científics de la Universitat de Pennsilvània van iniciar un assaig clínic de teràpia gènica per a la immunodeficiència severa combinada (SCID). Es va utilitzar un vector retroviral per transferir una còpia normal de l'adenosina desaminasa (ADA) a les cèl·lules T. La teràpia es va dur a terme en dos nens amb ADA SCID i va donar lloc a la normalització en el recompte de les cèl·lules T i una millora de la resposta immunitària. Així que la teràpia gènica es va considerar segura i eficaç ^{126,128}.

El camp va anar creixent i van començar a aparèixer alguns esdeveniments adversos relacionats amb la resposta immunitària o la mutagènesi insercional que van alentir la progressió de les teràpies gèniques clíniques i es va repensar des de la investigació preclínica com avançar. Els dos estudis més destacats que fan fer saltar les alertes van ser. Duna banda l'any 1999, un pacient diagnosticat d'una malaltia metabòlica per dèficit d'ornitina transcarbamilasa (OTC), va rebre altes dosis d'un vector adenoviral que codificava pel gen OTC, i va morir a causa d'un trastorn massiu de la coagulació en una resposta immunitària cap a l'adenovirus. Va ser la primera mort després d'una administració de teràpia gènica. L'any 2000, investigadors europeus a París van informar que en un assaig clínic de teràpia gènica per a la immunodeficiència severa combinada lligada al cromosoma X (X-SCID) basada amb un vector retroviral que transferia el gen del receptor de citocines (IL2RG), va comportar que en 5 dels 20 nens tractats es desenvolupés una leucèmia. Paral·lelament a Londres, en un estudi similar també es van donar alguns casos de leucèmia. El seguiment i anàlisi detallat de les cèl·lules modificades genèticament en aquests malalts va demostrar que la inserció del transgèn havia tingut lloc en una regió propera al protooncogen LMO2 donant lloc a la seva activació ¹²⁵.

L'Administració estatal xinesa d'aliments i medicaments (SFDA) uns anys més tard va ser la primera agència reguladora en aprovar un medicament de teràpia gènica. Va ser a l'any 2003 i 2005, quan va aprovar els dos productes respectivament. Gendicine (un vector adenoviral que transporta el gen de la P53), primer tractament de teràpia gènica indicat per al càncer de cap i coll, i l'Oncorine, el primer virus oncolític indicat per al carcinoma de nasofaringe. Una dècada més tard, al 2012, l'Agència Europea de Medicaments (EMA) va aprovar el primer producte europeu de teràpia gènica, Glybera, un vector viral adenoassociat indicat per a la deficiència de lipoproteïna lipasa. Quatre anys més tard, l'EMA va aprovar la primera teràpia gènica *ex vivo*, Strimvelis, que consistia en la utilització d'un vector retroviral portador del gen que codifica per l'ADA per modificar cèl·lules CD34+ procedents de pacients amb AD-SCID. Però la Food and Drug Administration (FDA) dels Estats Units no va ser fins al 2017 que va aprovar; Luxturna, el primer producte de teràpia gènica amb un virus adenoassociat (AAV) per al tractament de l'amaurosi congènita de Leber ¹²⁵.

Actualment, tenint en compte tot els assaigs clínics que hi ha, sembla que aquest prometedor camp de la medicina està avançant més ràpidament que mai, amb desenes de nous productes que busquen l'aprovació en un futur proper per poder tractar cada vegada més malalties ¹²⁵.

1.11.2 Estratègies d'edició genòmica

Les noves tecnologies d'edició del genoma permeten modificar l'expressió dels gens de manera més dirigida generant modificacions específiques en el genoma. L'edició del genoma es pot realitzar a les cèl·lules de manera *ex vivo*, o es pot lliurar *in vivo* la maquinaria d'edició genòmica per tal d'efectuar la modificació del genoma *in situ* ¹²⁹.

L'estratègia clàssica de modificació del genoma de forma dirigida, s'inicia mitjançant la creació d'un trencament doble cadena (DSB) induït per nucleases en la regió d'interès. Aquest trencament, estimula els mecanismes de reparació cel·lular com la reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ) o la reparació per homologia (HDR) ^{129,130}.

La reparació per unió d'extrems no homòlegs dona com a resultat la creació d'insercions o delecions (indels) en el lloc del trencament de doble cadena de l'ADN. Aquestes indels solen ser de longitud variable i generalment inactiven la funció del gen. La reparació dirigida per l'homologia, en canvi, s'activa quan a la cèl·lula hi ha un fragment d'ADN amb regions de seqüència homòloga als extrems deixats per la nucleasa.. Com a resultat de la recombinació, s'aconsegueix la correcció d'una mutació o la inserció de noves seqüències de manera específica en el genoma ¹²⁹.

Els primers estudis d'edició del genoma es basaven en l'enginyeria de nucleases de dit de zinc (ZFNs) o meganucleases, que eren específiques per la zona d'ADN on es volia introduir un DSB. Però aquestes plataformes de nucleases eren molt complexes i limitava el seu ús i aplicació ¹²⁹⁻¹³¹.

Anys més tard, es va desenvolupar una nova tècnica d'escissió del ADN mitjançant proteïnes bacterianes anomenades efectors semblants a l'activador de la transcripció (TALE) que es podien modificar fàcilment i això va portar a la creació de nucleases TALE (TALEN). Aquests enzims poden escindir de manera eficient qualsevol seqüència d'ADN d'interès. Tot i així, els enfocaments TALEN encara requereixen del disseny i modificació d'un parell específic de nucleases per a cada nou objectiu d'ADN i també tenen certa complexitat ¹²⁹⁻¹³¹.

El camp de l'edició del genoma va viure una revolució amb el descobriment d'un sistema de defensa bacteriana comprès de nucleases Cas, com la (Cas9) associades a CRISPR, que es podien programar de manera eficient per tallar l'ADN en llocs específics del genoma. En aquest sistema, simplement s'ha de dissenyar un ARN guia específic (gRNA) complementari al lloc d'interès del genoma i acompanyar-lo d'una nucleasa Cas. La tecnologia de la nucleasa CRISPR-Cas9 ha simplificat el procés d'edició del genoma i s'ha fet disponible en un gran nombre de laboratoris amb experiència en biologia molecular ¹²⁹⁻¹³².

Recentment però, han sortit dues tècniques d'edició genòmica que minimitzen les conseqüències no controlades i no desitjades de trencaments d'ADN de doble cadena (DSB). Per un costat hi ha els editors de bases (BEs), que utilitzen una proteïna programable d'unió a l'ADN, com per exemple una proteïna CRISPR-Cas, acompanyat d'un enzim corrector de bases per modificar o donar lloc a conversions de C•G a T•A o de A•T a G•C. Els editors de bases poden corregir mutacions de transició, la classe més gran de mutacions que causen malalties humanes, que representen aproximadament el 30% dels al·lels de malalties conegudes ^{130,131}.

D'altra banda, l'altra tècnica d'edició es el *prime editing* (PEs), que utilitza una proteïna Cas modificada per fer únicament un tall a una de les dues cadenes de ADN. Aquesta proteïna Cas porta unida una transcriptasa reversa que utilitza la guia de ARN del *prime editing* (pegARN) per sintetitzar nou ADN. De manera que aquest sistema pot substituir o inserir qualsevol seqüència desitjada en funció de la informació codificada a la pegARN. La pegARN té dues funcions principals, d'una banda, posiciona la Cas en una posició concreta de l'ADN i d'altra banda, com ja s'ha exposat, actua com a motlle per la transcriptasa reversa per a la síntesi d'ADN. Els editors Prime són molt versàtils i s'ha demostrat que són capaços d'instal·lar qualsevol canvi de base, així com insercions de fins a 44 parells de bases i supressions de fins a 80 parells de bases. En teoria, aquestes característiques podrien permetre als editors principals corregir fins al 89% de les mutacions humanes conegudes que causen malalties, excloent només les que impliquen aneuploidia, reordenació cromosòmica o grans duplicacions, insercions o supressions ^{130,131}.

Els enfocaments d'edició del genoma ofereixen un bisturí precís per corregir o alterar el genoma i poden superar molts dels inconvenients de les estratègies que es basen en la inserció genòmica aleatòria. A més, la regulació d'un gen introduït o corregit per aquest sistema, serà controlat pel promotor endogen, donant lloc a una expressió gènica més fisiològica i adequadament regulada. Aquests components *per se*, no tenen sistema de transferència a les cèl·lules, per tan s'han de lliurar mitjançant l'ús de vectors virals o no virals ^{129,130}.

1.11.3 Vectors de transferència

Els vectors ideals de teràpia gènica haurien de tenir una alta eficiència de transducció, la capacitat d'induir una expressió estable i a llarg termini, la capacitat suficient per transportar transgens grans, ser específics per a cèl·lules diana, ser capaços de transduir tant cèl·lules quiescents com en proliferació i evitar la inserció aleatòria i la mutagènesi ¹²⁵. Però això fins al moment ha estat impossible de trobar en un sol tipus de vector, de manera que s'han investigat i utilitzat diferents vectors segons les aplicacions (Figura 10).

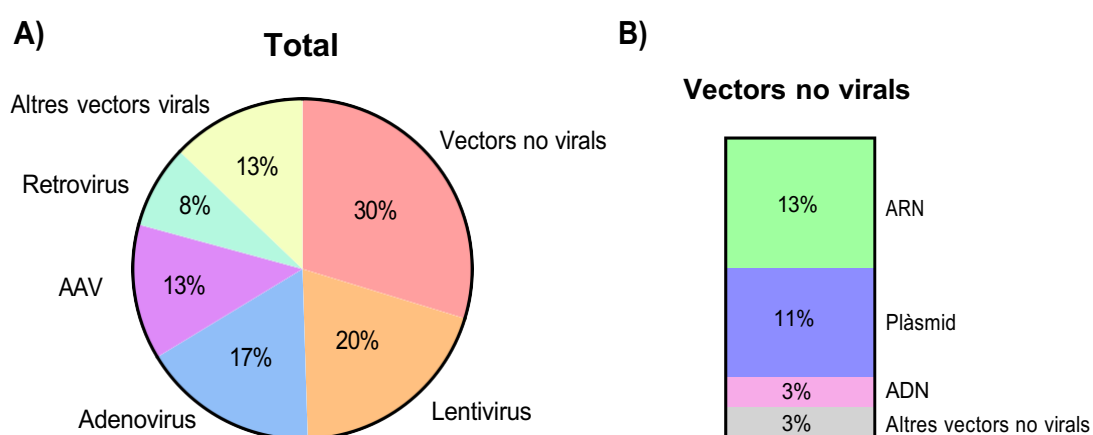


Figura 10. Tendències d'ús de diferents vectors en assaigs de teràpia gènica.

Adaptació de Arabi, 2022. A) Total de assaig clínic. B) Vectors no virals, percentatge del total.

Hi ha dos tipus de sistemes de transferència de gens basats en vectors virals i no virals. Els mètodes de lliurament viral utilitzen virus per a transportar l'ADN a una cèl·lula humana. Mentre que els mètodes no virals, faciliten la transferència d'ADN mitjançant mètodes físics, com la pistola de gens i la microinjecció, i químics, com els basats en lípids o polímers principalment ¹³³.

Els vectors virals, es caracteritzen per tenir una alta eficiència de transducció, i una bona capacitat d'enginyeria el que els ha permès cobrir un nombre elevat d'aplicacions en comparació amb els vectors no virals. En la generació dels vectors virals, els gens implicats en la replicació, el muntatge o la infecció del virus es substitueixen per gens terapèutics per crear vectors de teràpia gènica terapèutica amb deficiència de replicació, específics i segurs, generant un genoma que conté el gen terapèutic. Després aquest genoma serà empaquetat en cèl·lules on de manera transitòria se'ls fa arribar també els gens necessaris per a la formació de les partícules víriques¹²⁵.

La família dels retroviridae (inclosos els gamma-retrovirus i lentivirus) i els adenovirus (adenovirus i virus adenoassociats o AAV) són els vectors virals més comuns. Els vectors retrovirals permeten una expressió transgènica estable a llarg termini, ja que tenen la capacitat d'integrar-se al genoma de la cèl·lula hoste, però només poden infectar cèl·lules en divisió. Els vectors lentivirals, també donen lloc a una expressió estable, però a part de les cèl·lules en divisió, també poden infectar cèl·lules que no es divideixen i a més a més poden transportar cassets de gens més grans i complexos que els vectors retrovirals. Els vectors lentivirals i retrovirals s'utilitzen principalment en la generació de cèl·lules CAR-T i cèl·lules T modificades amb TCR, i en la majoria de les aplicacions de teràpia gènica en cèl·lules mare hematopoètiques^{125,126,129}.

Els adenovirus, tot i ser també utilitzats com a vectors adenovirals la seva aplicació més coneguda és com a virus oncolítics i vacunes virals degut al seu cicle lític, l'alta capacitat d'expressió transgènica i d'infecció d'una àmplia gamma de cèl·lules quiescents i proliferants.

Els AAV es troben entre els candidats més prometedors per a aplicacions *in vivo*. Poden infectar tant cèl·lules que es divideixen com que no es divideixen, donant lloc a una expressió transgènica a llarg termini. A més, no causen cap malaltia coneguda en humans, i el risc de mutagènesi per inserció és baix a causa de la seva freqüència d'integració extremadament baixa^{125,126}.

Els vectors no virals, tot i tenir un perfil de seguretat més alt, disposen de poca eficiència pel que fa a l'expressió gènica, tant en els nivells d'expressió com en la durada^{125,126}.

1.11.4 Estratègies de transferència gènica

El lliurament de material genètic a les cèl·lules pot fer-se a través de d'una estratègia *in vivo* o *ex vivo* (Figura 11). La teràpia gènica *in vivo*, consisteix a introduir un vector al cos d'un pacient, permetent que el procés de transferència gènica tingui lloc completament dins del cos. Ja sigui per via sistèmica o per injecció directa al teixit diana ^{125,134}.

Mentre que per a les aplicacions *ex vivo*, primerament comprèn l'aïllament de les cèl·lules diana, ja siguin del pacient (autòlogues) o d'un donant (al·logèniques). A continuació, s'utilitza un vector per introduir el gen terapèutic a la cèl·lula i modificar-la genèticament. Després d'una activació o expansió, les cèl·lules transduïdes en el laboratori es reintrodueixen al pacient ¹²⁵.

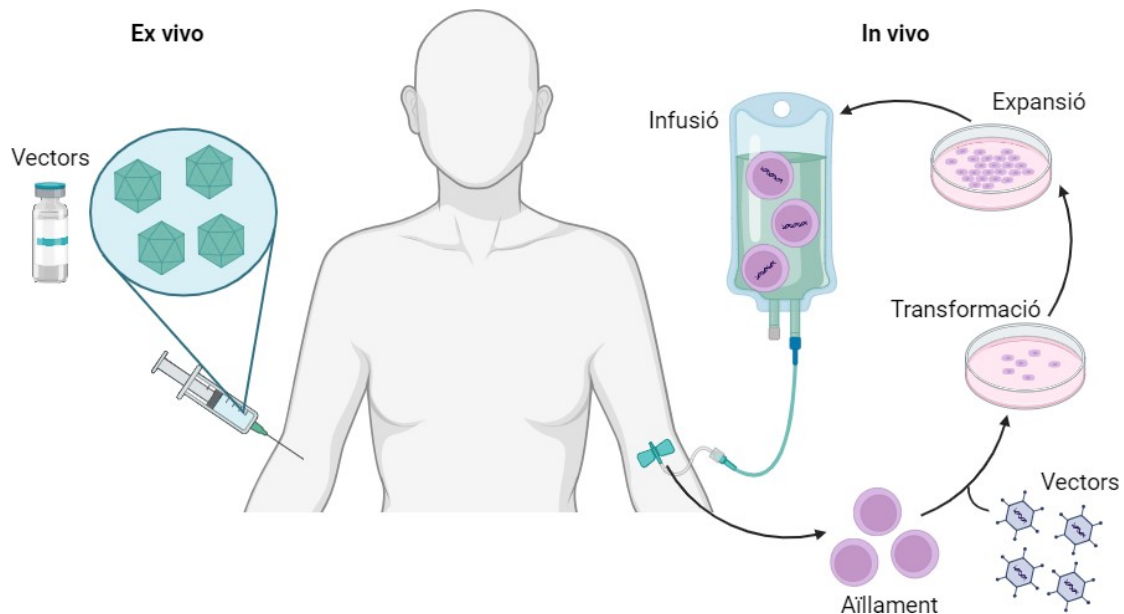


Figura 11. Sistemes de lliurament *in vivo* i *ex vivo*.

Adaptació de Kauffman 2013 i Pupo 2022.

Tes dues estratègies tenen avantatges i desavantatges. La teràpia gènica *ex vivo* permet la selecció, expansió i control de qualitat de les cèl·lules modificades abans de la reinfusió, proporcionant una major seguretat i eficàcia. Tanmateix, requereix l'ús de vectors integratius que permetin l'estabilitat del transgèn durant l'expansió cel·lular, el que tampoc és exempt de limitacions. La transferència *in vivo* és el mètode d'elecció quan les cèl·lules no es poden separar del cos o no poden viure *ex vivo* durant molt de temps. A més a més, el mètode *in vivo* és el més adequat per als teixits de fàcil accés. Tanmateix, el contacte del vector amb les cèl·lules inespecífiques, proporciona un major risc de reaccions immunitàries ¹²⁵.

1.11.5 Vies d'administració

El lliurament de la càrrega gènica al teixit diana depèn en gran mesura de dos aspectes; la via d'administració seleccionada i el tipus de vectors utilitzats. Els vectors virals mostren de manera innata tropisme cap a certs tipus de cèl·lules i teixits. Per a la redirecció a teixits o a cèl·lules diana d'interès es realitzen estratègies de modificació en les proteïnes o molècules de la superfície del vector ¹²⁶.

La ruta d'administració també juga un paper decisiu en la determinació del destí del vector per això hi ha diverses maneres d'administrar la teràpia gènica *in vivo*, amb estratègies sistèmiques com l'administració oral, l'intraperitoneal, o l' intravenosa o injeccions locoregionals.

L'administració intravenosa és una de les vies més emprades per aconseguir un efecte sistèmic. Tanmateix, la seva àmplia biodistribució obliga a fer dissenys selectius dels vectors per tal d'evitar possibles efectes adversos ¹²⁶.

L'administració locoregional permet lliurar el transgèn directament al teixit d'interès. Destaquen la via intracerebroventricular, intraparenquima, intratecal o cisterna magna si es vol accedir a sistema nerviós o la via intramuscular, si el nostre teixit diana és el múscul ¹²⁶.

1.11.6 Aplicacions clíniques

Tot i que la teràpia gènica es va concebre inicialment com a tractament per a alguns trastorns genètics, el càncer és la malaltia que inclou la majoria dels assaigs clínics de teràpia gènica (Figura 12). Els càncers hematològics són els càncers amb més assaigs, en part gràcies al desenvolupament de les cèl·lules CAR-T, i el segueixen els càncers gastrointestinals i els genitourinaris ^{125,126}.

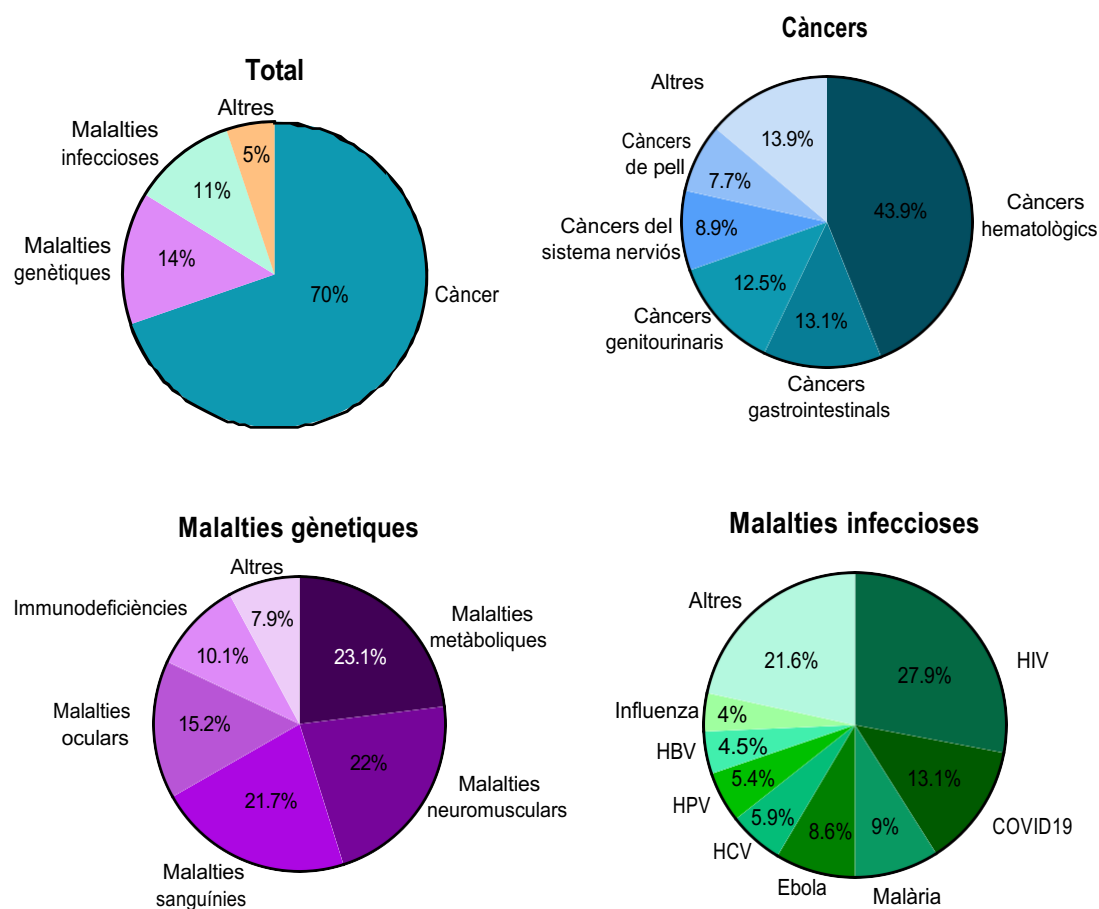


Figura 12. Assajos de teràpia gènica de 2010 al 2020.

Adaptació de Arabi 2022. A) Tipus de malalties més freqüents en què es van centrar els assaigs clínics de teràpia gènica. B) Distribució dels assaigs clínics de teràpia gènica en càncer. C) Distribució dels assaigs clínics de teràpia gènica en malalties genètiques. D) Distribució dels assaigs clínics de teràpia gènica en malalties infeccioses (HIV - Virus de la immunodeficiència humana, COVID19 – Coronavirus, HCV - Virus de l'hepatitis C, HPV - Virus del papil·loma humà, HBV - Virus de l'hepatitis B).

Els assaigs de teràpia gènica en càncer, majoritàriament son estudis en fase 1. Tot i que el nombre d'assaigs de fase 2 és força elevat, mentre que només un petit nombre es troben en fase 3. Fins ara s'han aprovat diversos productes de teràpia gènica per al tractament del càncer, com ara gendicina, oncorina, rexina-G, imlygic, delytact i vuit cèl·lules T CAR, incloses kymriah, yescarta, tecartus, breyanzi, abecma, ARI-0001, cartheyva i carvykti ^{125,126}.

El segon grup amb un major nombre d'assajos clínics de teràpia gènica en desenvolupament son pel tractament de trastorns genètics, com la talassèmia, la distròfia muscular de Duchenne (DMD) i la fibrosi quística. De fet els trastorns metabòlics són els que disposen de més assaigs, seguit de trastorns neuromusculars i sanguinis. La majoria d'aquests assaigs clínics són estratègies *in vivo*, sent els vectors AAV els més utilitzats. En comparació amb els de càncer, la proporció d'assaigs clínics de fase 3 per a malalties genètiques és molt més alta així com, el nombre de productes aprovats. Es disposa de productes aprovats per a ADA-SCID, DMD, atrofia muscular espinal (SMA), amaurosis congènita de Leber (LCA), B-talassèmia i una sèrie de trastorns metabòlics (deficiència de lipoproteïna lipasa familiar, hipercolesterolèmia primària i familiar, amiloïdosi transtiretina hereditària, síndrome de quilomicronèmia familiar de l'adult, leucodistròfia metacromàtica i adrenoleucodistròfia cerebral ^{125,126}.

Des de fa una dècada, la teràpia gènica ha estat una opció terapèutica per a les malalties infeccioses com la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) o la malària. Amb l'aparició de la pandèmia per COVID-19, el nombre d'assaigs en aquesta tipologia de malalties s'ha vist incrementada. La SIDA, la COVID-19, la malària, l'Ebola, l'hepatitis C, la infecció per virus del papil·loma humà i l'hepatitis B són les malalties infeccioses amb el major nombre d'assaigs clínics. La majoria dels assaigs clínics van utilitzar l'estratègia de vacunació per induir immunitat contra les malalties corresponents. Només hi ha unes poques teràpies gèniques per a malalties infeccioses en etapes avançades, sembla que encara hi ha un llarg camí per recórrer abans que es puguin abordar eficaçment aquestes malalties ¹²⁵.

Tanmateix, la teràpia gènica no s'ha utilitzat únicament en aquest tres grans grup de malalties sinó que també s'han desenvolupat assajos clínics per malalties vasculars perifèriques, osteoartritis, retinopatia diabètica, degeneració macular, malaltia de l'artèria coronària, isquèmia i infart de miocardi, neuropatia diabètica, rinitis al·lèrgica, insuficiència cardíaca i cicatriu hipertròfica ¹²⁵.

1.12 Vectors AAV

Els virus adenoassociats (AAV) són virus d'ADN que posseeixen una càpsida proteica sense embolcall i que pertanyen a la família dels Parvoviridae. El seu genoma d'ADN, en conformació nativa és monocatenari. Però de forma artificial es poden sintetitzar amb una conformació en forma d'ADN autocomplementari o de doble cadena ¹³⁵.

Es van aïllar per primera vegada el 1965, com a contaminants en les preparacions d'un adenovirus (Ad) de simi ¹³⁶ (Figura 13). Al principi es creia que eren virus incompetents perquè per infectar de manera productiva les cèl·lules havia d'haver-hi una coinfecció d'un virus auxiliar. Després de ser considerats durant molt de temps com a virus defectuosos a causa de la seva codependència, estudis posteriors sobre els AAV van desmentir aquesta teoria. I van demostrar que més aviat el que es produïa era una infecció latent a la cèl·lula hoste, que podria convertir-se en una infecció productiva sota estrès ¹³⁷⁻¹³⁹.

Generalment, aquests virus auxiliars que necessiten els AAV per replicar-se i completar el seu cicle de vida, són adenovirus o herpesvirus, que tenen un cicle lític. Degut a que principalment requereixen la presència d' adenovirus per poder infectar les cèl·lules se'ls va anomenar com "adenoassociats" i classificar en el gènere de Dependovirus ¹³⁵.

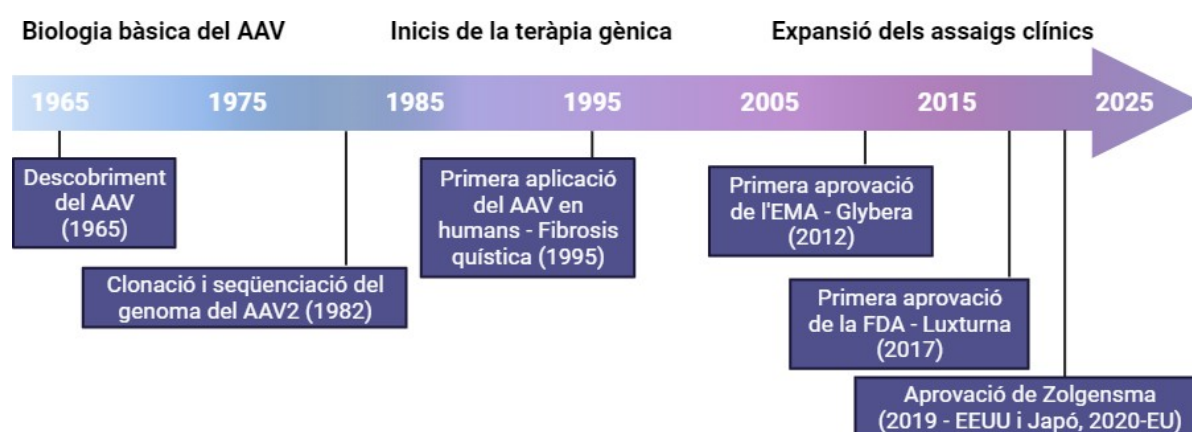


Figura 13. 60 anys d'AAV.

Adaptació de Wang 2019. Línia temporal que mostra les fites clau en el desenvolupament de la teràpia gènica amb virus adenoassociats.

S'ha estimat que entre el 50% i el 96% de la població humana és seropositiu per al serotip 2 d'AAV (AAV2). Tot i que els AAV tenen una alta seroprevalença en humans, són poc immunogènics en comparació amb altres virus, com per exemple, l'adenovirus. A més a més, no s'han relacionat amb cap malaltia ni en humans ni en cap altra espècie. Els AAV tenen una gran capacitat per infectar una àmplia gamma d'espècies i degut això s'han detectat AAVs en mostres avians, caprines, bovines i equines ^{135,140}.

Aquesta característica fa que els AAV siguin un candidat atractiu per a la teràpia gènica i actualment, es consideren el vector de transferència més utilitzat en les estratègies *in vivo* per a una varietat de trastorns genètics i malalties hereditàries ^{140,141}.

1.12.1 Característiques moleculars dels AAVs

Tots els AAV comparteixen una estructura i propietats similars, i són fàcils de manipular, ja que les seves partícules poden mantenir l'estabilitat biològica en condicions extremes de pH i temperatura. Comparteixen un genoma d'aproximadament 4,7 kb d'ADN de cadena simple que està empaquetat en una càpsida icosaèdrica, sense embolcall, amb un diàmetre de 20-25nm ^{135,140}.

Com a dependoparvovirus, l'AAV no té els gens essencials necessaris per a la replicació i l'expressió del seu propi genoma. Aquestes funcions les proporcionen els gens del Adenovirus E1, E2a, E4 i VA. El genoma AAV consta principalment de dos gens virals: rep (replicació) i cap (càpside), flanquejats per repeticions terminals invertides (ITR) de 145 nucleòtids. Com que les ITR tenen una seqüència palindròmica de nucleòtids, creen unes estructures característiques en forma de T, que són elements estructurals essencials per a la replicació i empaquetament del genoma viral. Les ITR també tenen un paper regulador en l'expressió gènica viral i la integració del genoma a l'hoste ^{135,140}.

Els AAV tenen quatre marcs oberts de lectura. El primer marc obert de lectura (ORF) es el de rep que codifica per diverses proteïnes no estructurals que són necessàries per a la regulació gènica, replicació, transcripció i encapsidació del AAV. Codifica per les quatre proteïnes de replicació (rep), que reben el nom dels seus pesos moleculars: Rep40, Rep52, Rep 68 i Rep78.126 ^{135,140}.

El segon ORF és el gen cap que codifica per a les tres proteïnes estructurals de la càpsida viral: la proteïna virió 1 (VP1), VP2 i VP3, amb una proporció molar d'1:1:10 en les partícules del AAV. Els diferents tropismes tissulars dels diversos serotips d'AAV resulten de variacions en el processament d'aquesta ORF de cap, que condueix a una varietat de perfils immunes i de transducció ^{135,140}.

El tercer i el quart són ARNm de dues proteïnes accessorïes. La primera és la proteïna activadora de l'assemblatge (AAP), que està implicada en el transport dels monòmers de la càpsida fins al nucli on té lloc l'assemblatge. La segona és la recentment descoberta proteïna accessorïa associada a la membrana (MAAP), de la qual no se sap ven bé la seva funció (Figura 14) ¹⁴⁰.

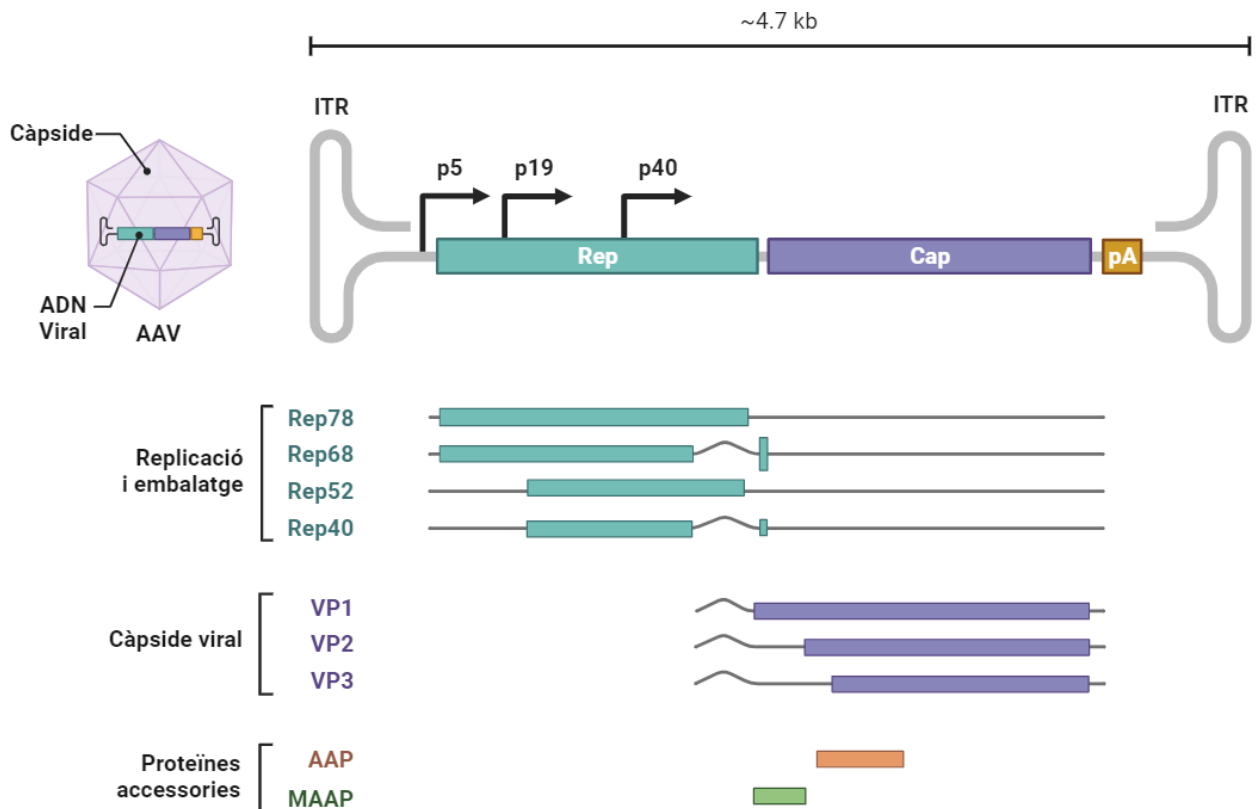


Figura 14. Esquema del genoma de l'AAV.

Adaptació de Pupo 2022. El genoma AAV constava de quatre marcs de lectura oberts coneguts, rep (blau), cap (lila), MAAP (verd) i AAP (taronja). Els ORF rep i cap codifiquen quatre i tres isoformes, respectivament. La transcripció és impulsada pels promotors virals P5, P19 i P40 (fletxes negres). El genoma està flanquejat per seqüències de repetició terminal invertida (ITR, gris).

1.12.2 Cicle vital del AAV

En el seu cicle vital (Figura 15), els virus adenoassociats, en funció del seu serotip, s'uneixen a diferents receptors de glicoproteïnes de superfície cel·lular i als receptors secundaris de l'hoste per tal d'infectar les cèl·lules. En unir-se a la superfície cel·lular, es desencadena la internalització del virus mitjançant l'endocitosi vehiculada per clatrina. Aleshores, la partícula de l'AAV circula pel citosol a través de la xarxa del citoesquelet transportat en vesícules endosòmiques. A causa dels ambients de pH baix d'aquestes vesícules, la càpsida experimenta un canvi conformacional per exposar els dominis VP1 i 2 ^{140,142}.

Mitjançant un mecanisme encara no del tot elucidat, la regió VP1, que conté un domini fosfolipasa, permet que l'AAV escapi de l'endosoma o lisosoma, i es traslladi al nucli mitjançant senyals de localització nuclear que es troben a VP2 a través dels porus nuclears. O pot ser que al escapar del lisosoma, l'AAV pateixi una proteòlisi al proteosoma ^{140,142}.

Un cop dins del nucli, el virus es desencapsida i el genoma del AAV se sotmet a la síntesi de la segona cadena per formar la configuració de doble cadena necessària per a la transcripció gènica. Aquesta conversió es pot aconseguir mitjançant la ADN polimerases de la cèl·lula hoste que sintetitzarà la nova cadena. O mitjançant l'acoblament de les cadenes de sentit i les d'antisentit que hi ha en les diferents càpsides d'AAV. Com que els AAV híbrids de doble cadena ja tenen aquesta configuració, un cop entren al nucli comencen la seva transcripció ^{140,142}.

A més, les ITR poden impulsar la recombinació intermolecular o intramolecular per formar genomes episòmics circularitzats que poden persistir al nucli degut a la seva estabilitat. El genoma de l'AAV també es pot integrar en el genoma hoste, però amb una freqüència molt baixa. El lloc d'integració més conegut en el genoma humà és una posició del cromosoma 19 anomenada AAVS1 ^{140,142}.

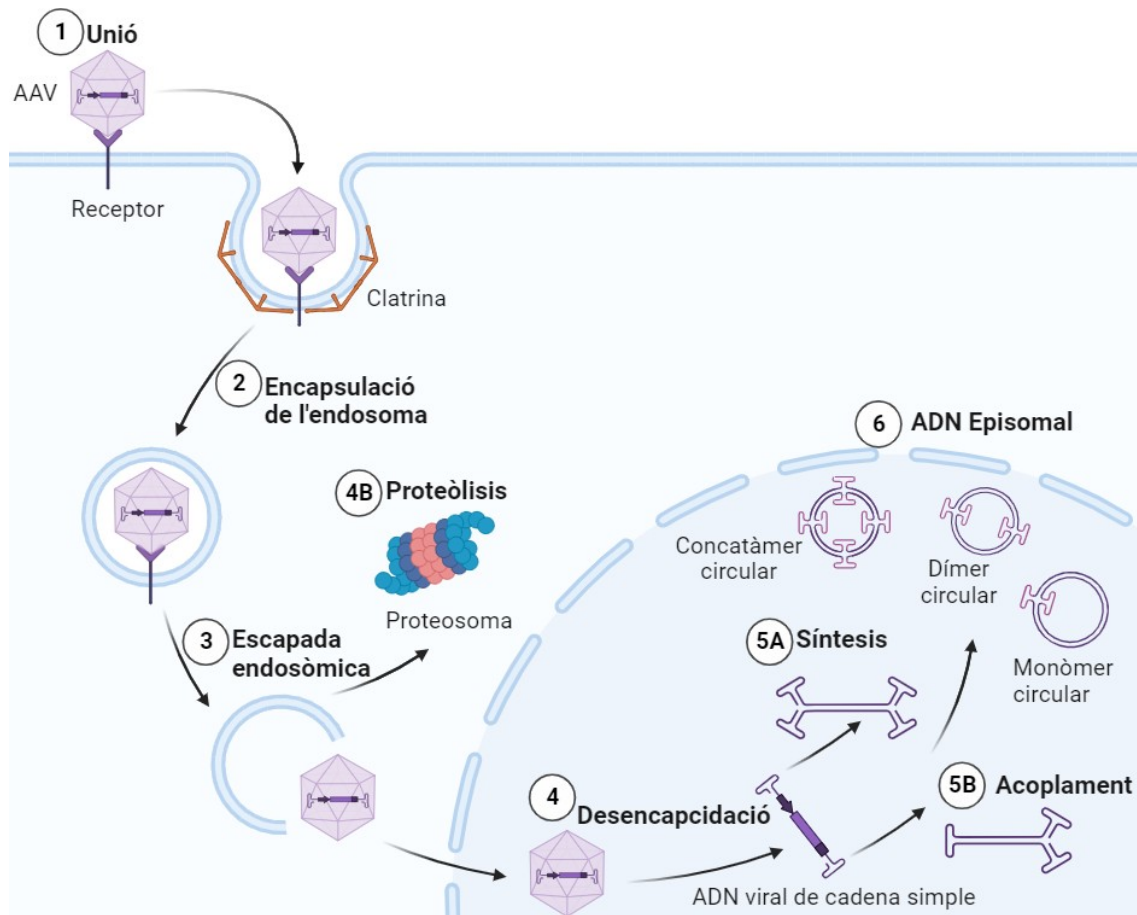


Figura 15. Diagrama de la via de transducció del AAV.

Adaptació de Wang 2019.

Quan una cèl·lula està infectada de forma latent amb un AAV i es realitza una infecció amb un virus auxiliar, o quan es du a terme una coinfecció amb AAV i un virus auxiliar, com l'adenovirus o el virus de l'herpes, un cop arribat al nucli, s'activa el programa d'expressió gènica del AAV. Comença per activar l'expressió del clúster de gens de rep per a la replicació dels genomes virals, seguidament del clúster de cap per a l'empaquetament del genoma viral. En el cas que hi hagi hagut una integració en el genoma, l'inici d'expressió de rep també provoca l'escissió del genoma del AAV del locus AAVS1 de la cèl·lula hoste. Després de la lisi cel·lular induïda pel virus auxiliar, s'alliberen els virions recentment muntats (Figura 16) ¹⁴³.

La inducció de la fase lítica del cicle de vida de l'AAV també es pot produir en absència d'un virus auxiliar, encara que amb una eficiència menor, quan la cèl·lula hoste està sotmesa a situació de stres cel·lular com inhibidors metabòlics, UV, radiació o compostos genotòxics¹⁴³.

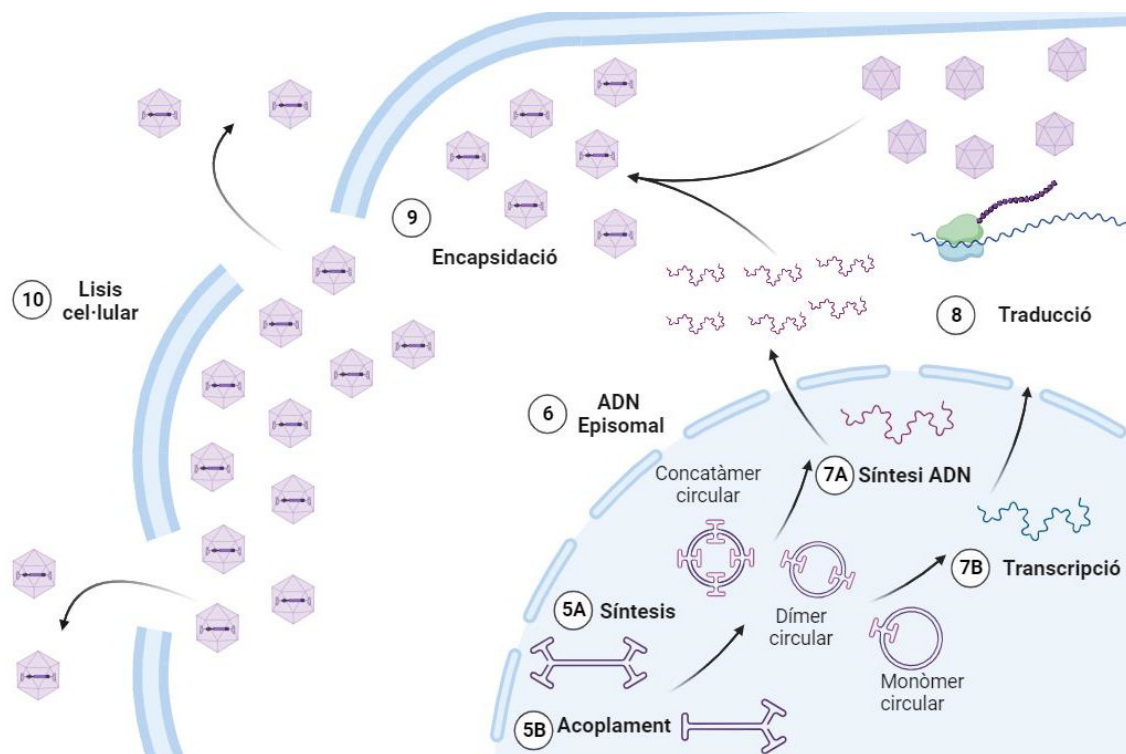


Figura 16. Diagrama del cycle vital del AAV.

1.12.3 Serotips, tropisme i mecanismes de transducció

Fins a 13 serotips d'AAV han estat els principals estudiats. Les seves estructures atòmiques demostren que la variabilitat de la seqüència es troba a les regions exposades a la superfície de la càpsida, la part més important per a les interaccions hoste-vector a través dels receptors i que dona l'especificitat per la cèl·lula diana (Figura 17 i Taula 4). Aquesta versatilitat proporciona als vectors AAV una plataforma altament adaptable per dirigir al teixit desitjat ¹⁴⁰.

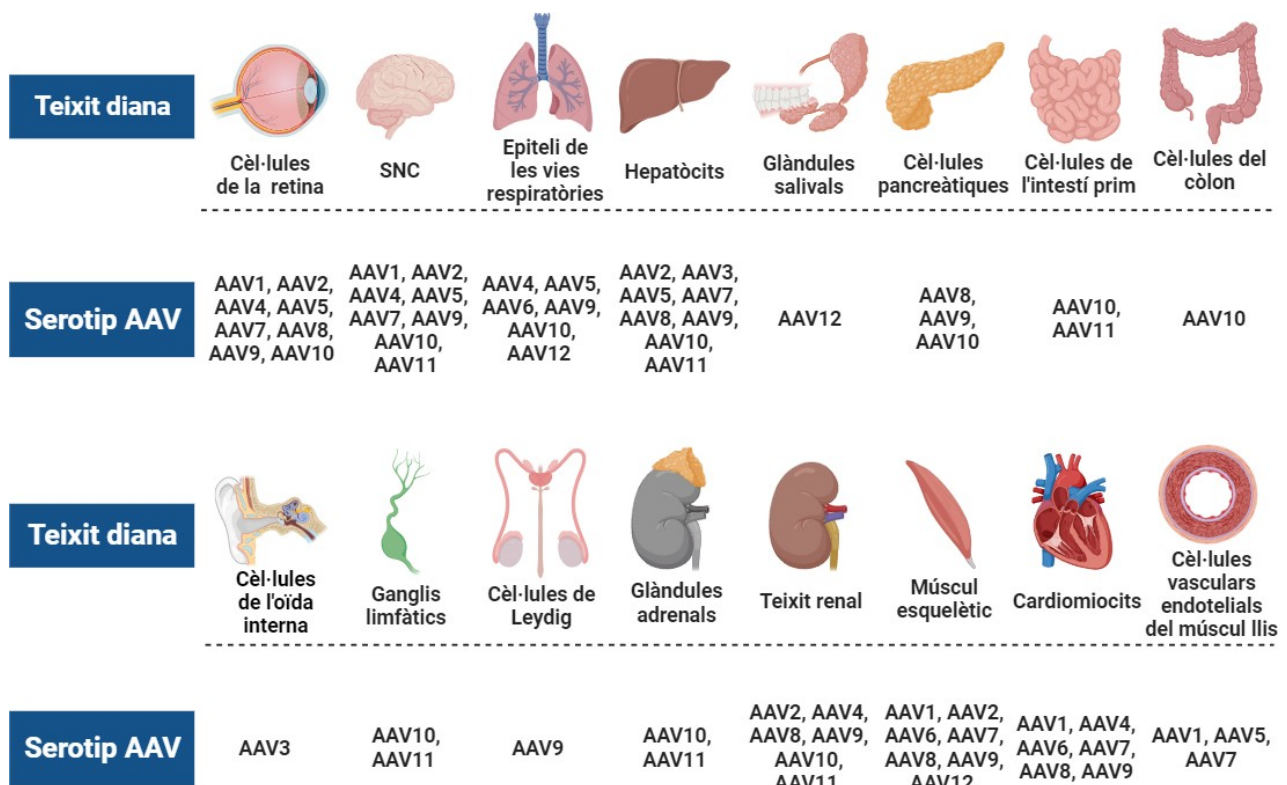


Figura 17. Classificació dels serotips d'AAV segons els seu tropisme.

Adaptació de Issa 2023.

L'AAV1 va ser el primer vector viral aprovat per al seu ús en teràpia gènica en humans ¹⁴⁴. A més a més, es va trobar que AAV1 era el serotip més eficient per a la transducció dels músculs esquelètics ¹⁴⁵.

L'AAV2 es considera el serotip més estudiat entre tots els AAV⁴⁶ i va ser el primer en ser descobert ¹³⁶. Per això la majoria de virus AAV que es generen es fan a partir del genoma del AAV2 i la càpside del serotip amb el tropisme d'interès. Aquesta flexibilitat de generació d'aquests virus mosaic genoma/càpside en els AAVs els proporciona un espectre de transducció més ampli ^{135,140}.

L'AAV3 inicialment no es va considerar degut a la baixa eficiència de transducció *in vitro* i en línies cel·lulars murines. Tanmateix, estudis posteriors, van mostrar una transducció extremadament eficient en cèl·lules de càncer hepàtic, i en conseqüència es va reprendre el seu interès terapèutic¹⁴⁷.

L'AAV4 es considera un dels serotips més diferents a nivell antigènic. La seva topologia de superfície de la càpsida comparteix una similitud significativa amb la del parvovirus humà B19 i el virus de la malaltia del visó aleutià. Tenen especial tropisme per les cèl·lules del epitel·li pigmentari de la retina (RPE) i per tant s'ha utilitzat a mode d'estudi per a teràpies relacionades com la amaurosis congènita de Leber ^{148,149}.

L'AAV5 es el serotip que es considera més divergent genèticament de tots els AAV. Amb una varietat de característiques úniques, com ara la mida i la funció de les seves regions ITR que són diferents a la resta de serotips. Una altra característica distintiva de l'AAV5 és la seva capacitat de transduir cèl·lules que no es poden transduir amb l'AAV2 ^{135,140}.

La classificació del sisè serotip d'AAV (AAV6) encara és una qüestió de controvèrsia, ja que presenta una gran similitud genòmica amb els serotips AAV1 i AAV2, però tot i així se li ha assignat la seva pròpia numeració de serotips. L'AAV6 té un perfil serològic gairebé idèntic al de l'AAV1 i comparteix la seva seqüència codificant amb un percentatge d'homologia del 99%, juntament amb múltiples regions idèntiques a les d'AAV2. En conseqüència, es va suggerir que es tracta d'un híbrid natural que resulta de la recombinació homòloga entre AAV1 i AAV2 ¹³⁵.

En investigar l'epidemiologia dels anticossos neutralitzants contra els AAV a la població mundial, es va trobar que la seroprevalència d'anticossos del AAV7 era relativament baixa en humans. Un avantatge que posseeix aquest serotip per a ser utilitzat en aplicacions clíniques ¹⁵⁰.

L'AAV8 és més conegut pel seu fort tropisme cap a les cèl·lules hepàtiques i, per tant, una alta eficiència de transducció dels hepatòcits, que és molt més forta i ràpida que la de tots els altres serotips AAV en diferents models animals ¹³⁵.

A la majoria dels teixits, l'AAV9 sembla aconseguir una transducció cel·lular amb una eficiència superior a la d'altres AAV, una millor distribució del seu genoma i els nivells d'expressió proteica més alts. A més, té una característica única en comparació amb la resta de serotips, i es que pot travessar el BHE i transduir no només cèl·lules neuronals sinó també no neuronals, inclosos els astròcits, que normalment no poden ser transduïts pels altres serotips ¹³⁵.

Els serotips AAV10, AAV11, AAV12 i AAV13, són els menys estudiats, sobretot els 3 últims i encara es desconeix quins receptors cel·lulars i coreceptors utilitzen per a la unió i entrada a les seves cèl·lules diana ¹³⁵.

El desè i onzè serotip d'AAVs, tenen les proteïnes de la càpside molt semblants a l' AAV8 i AAV4, respectivament. Donant lloc a una reactivitat creuada a nivell serològic amb aquests dos serotips. Tanmateix, no es va trobar que tinguessin cap reactivitat creuada front a AAV2, la qual cosa els fa bons candidats com a vectors virals de teràpia gènica en individus amb anticossos contra AAV2¹³⁵.

El dotzè serotip (AAV12), és resistent a la neutralització dels anticossos humans, i per tant, representa un bon candidat per a aplicacions de teràpia gènica en humans. I del tretzè serotip (AAV13) se sap que comparteix similitud estructural amb AAV2 i AAV3¹³⁵.

Serotip d'AAV	Origen	Receptor primari	Altres coreceptors	Modificacions post traduccionals
AAV1	Primat	Àcid siàlic	Receptor AAV (AAVR)	-
AAV2	Humà	HSPG	FGFR1, integrines $\alpha V\beta 5$ i $\alpha 5\beta 1$, HGFR, LR, i CD9	Ubiquitinació, fosforilació, sumoilació i glicosilació
AAV3	Humà	HSPG	FGFR1, LR, i HGFR	Acetilació, fosforilació i glicosilació
AAV4	Primats no humans	Àcid siàlic	-	Ubiquitinació
AAV5	Humà	Àcid siàlic	PDGFR (α i β)	Ubiquitinació, fosforilació, sumoilació i glicosilació
AAV6	Humà	Àcid siàlic i HSPG	EGFR	Acetilació
AAV7	Macac rhesus	-	-	Glicosilació, fosforilació, sumoilació i acetilació
AAV8	Macac rhesus	LR	-	Fosforilació, glicosilació i acetilació

AAV9	Humà	Galactosa terminal N-enllaçada	Integrina putativa, LR	Glicosilació, ubiquitinació, fosforilació, sumoilació i acetilació
AAV10	Mico cynomolgus	-	-	Glicosilació, ubiquitinació, fosforilació, sumoilació i acetilació
AAV11	Mico cynomolgus	-	-	-
AAV12	Primats no humans	La manosa i la mannosamina s'han suggerit com a components d'un receptor potencial complex		-
AAV13	Primats no humans	-	HSPG	-

Taula 4. Característiques dels diferents serotips AAV.

Adaptació de Issa 2023 i Pupo 2022. (AAVR – Receptor d'AAV, HSPG - Proteoglicà de heparan sulfato, FGFR1 - Receptor 1 del factor de creixement dels fibroblasts, HGFR - Receptor del factor de creixement dels hepatòcits, LR – Receptor de laminina, CD9 – *Cluster of differentiation* 9, PDGFR - Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes, EGFR - Receptor del factor de creixement epidèrmic).

A més dels serotips AAV naturals descrits anteriorment, s'han desenvolupat nous vectors AAV durant les dues últimes dècades i encara se n'estan desenvolupant. Mitjançant diferents estratègies d'enginyeria, s'han generat nous vectors híbrids per tal de millorar la seva transducció, modular la seva immunogenicitat o limitar el seu tropisme a cèl·lules específiques^{135,140}.

1.12.4 Limitacions de l'ús de AAV com a vectors

Tot i els nombrosos avantatges que presenten els AAV, encara tenen algunes limitacions. Un exemple d'aquestes limitacions, és la capacitat limitada de clonació dels AAV, que se situa en les, ~ 4,5 Kb. De manera que els transgens que son superiors a aquesta mida no es poden inserir en el seu genoma, limitant el nombre de transgens i les malalties a tractar. A més, els AAV necessiten convertir el seu ADN de cadena simple en ADN de doble cadena per poder expressar la proteïna transgènica. Això pot provocar un retard en l'expressió del transgèn, en comparació amb els vectors de doble cadena. La generació dels vectors autocomplementaris sobrepassa aquesta limitació però només serà possible en transgens molt petits, ja que cal incorporar les dues cadenes de ADN la necessitat d'espai és major ^{140,151}.

La presència d'anticossos neutralitzants presenta una prevalença elevada entre els humans tot i que varia en funció del serotip del virus i de la ubicació geogràfica de la població. Aquests anticossos neutralitzants fan que hi hagi una immunitat preexistent als AAVs, o que es produeixi una resposta immunitària després de la primera introducció d'un vector viral. Aquesta immunitat preexistent, pot ser un obstacle important en el desenvolupament d'una teràpia gènica basada en AAV o altres vectors virals, ja que els anticossos neutralitzants poden tenir un impacte significatiu en l'eficiència de la transferència gènica. A més a més, en diverses malalties, podria ser necessària l'administració seqüencial de AAVs, el que provocaria el desenvolupament d'una resposta immune contra el vector viral ^{135,140}.

Malgrat el ritme ràpid d'aplicacions de vectors AAV, cal anar en compte ja que clarament s'ha observat una toxicitat depenent de la dosi del vector mediada per una forta resposta immunitària ¹⁴⁰. Aquest va ser el cas d'un pacient de 27 anys que patia disfòria muscular de Duchenne que participava en un assaig clínic en fase 3 per a una teràpia gènica. El pacient va rebre una dosi alta del AAV9 de l'assaig, $1 \cdot 10^{14}$ vg/kg, i no va sobreviure més enllà de 8 dies. Es creu que l'avançat estat de la DMD i la alta dosi rebuda no li van permetre tolerar l'estrès cardiopulmonar associat a la toxicitat aguda resultant de la teràpia gènica ¹⁵². A partir d'aquí l'assaig clínic s'ha limitat a nens d'entre 4 i 8 anys.

1.12.5 Assaigs clínics AAV i productes terapèutics

Actualment existeixen més de 90 assaigs clínics en els que s'utilitzen els AAVs com a vectors terapèutics. Entre aquests assaigs, n'hi ha per a malalties minoritàries i sobretot per a malalties que afecten el sistema nerviós central.

Hi ha diversos fàrmacs de teràpia gènica aprovats per agències reguladores que han arribat al mercat comercial basats en AAV a tot el món. Glybera (alipogene tiparvovec) va ser el primer que va obtenir l'aprovació al 2012 per l'Agència Europea del Medicament. Era una teràpia gènica basada en un AAV1 que administrava lipoproteïna lipasa (LPL) a pacients amb deficiència de LPL. A causa de la baixa demanda i el seu alt cost, Glybera es va retirar dels mercats europeus i encara no ha obtingut l'aprovació a altres països. En total, només quatre pacients fora dels assaigs clínics van rebre el fàrmac, tres dels quals només van pagar 1 € per gastar les existències restants no utilitzades ^{140,153}.

Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl) va ser el segon fàrmac amb AAVs que va obtenir l'aprovació comercial el 2017 per la Food and Drug Administration (FDA) als Estats Units. Luxturna és un tractament basat en un AAV2 que lliura la isomerohidrolasa retinoide RPE65, que és una proteïna afectada que provoca ceguesa progressiva en l'amaurosi congènita de Leber^{140,153}.

S'han tractat i es continuen tractant nombrosos pacients en molts països amb Luxturna ja que els estudis d'eficàcia recollits en diferents proves de mobilitat van mostrar una gran millora. De fet, fins i tot després d'un any de tractament, els pacients tractats amb Luxturna milloràvem la puntuació en el recorregut de les proves de mobilitat. A més, 13 dels 21 pacients (62%) tractats van superar les proves al nivell de llum més baix, mentre que cap dels pacients que no va rebre el medicament va ser capaç de fer-ho. La millora de la visió dels pacients es va mantenir durant almenys tres anys ¹⁵⁴.

Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) és el tercer fàrmac aprovat, que es va desenvolupar pel tractament de l'atròfia muscular espinal (SMA). Va obtenir l'aprovació als Estats Units i al Japó al 2019, i va rebre l'aprovació a la Unió Europea el 2020. Zolgensma és una teràpia gènica basada en un AAV9 recombinant que transporta el gen SMN1) ^{140,153}. Zolgensma s'ha vist que redueix la necessitat de ventilació artificial en nadons amb atròfia muscular espinal. De fet, 20 dels 22 nadons que van rebre el tractament estan vius i respiren sense la necessitat d'un ventilador permanent, fins a 14 mesos post-tractament. A més a més, 14 dels 20 nadons després de 18 mesos del tractament podien seure sense ajuda durant almenys 30 segons, cosa que els nadons no tractats no arriben a aconseguir mai ¹⁵⁴. Tal i com hem comentat anteriorment, la seva aplicació però va resultar en la mort d'un pacient al aplicar una dosi molt alta del vector.

Un quart producte aprovat per la EMA al 2022, és Uptaza, un tractament de teràpia gènica mitjançant un AAV2 per corregir la deficiència severa de la L-aminoàcid descarboxilasa aromàtica (AADC). L'AADC és una malaltia hereditària que afecta el sistema nerviós i provoca símptomes com retards en el desenvolupament, to muscular baix i incapacitat per controlar el moviment de les extremitats. Aquest tractament es va aplicar a un grup de pacients d'entre 1 i 9 anys d'edat observant-se que al voltant del 70% (14 de 20) dels pacients eren capaços de controlar el moviment del cap i al voltant del 65% (12 de 20) dels pacients podien seure sense ajuda, dos anys després del tractament. Mentre que els pacients amb AADC que no havien rebut cap tractament, no podien assolir cap d'aquestes dues fites ¹⁵⁴.

Més tard, també l'any 2022, va ser aprovat un tractament per a la hemofília A, Roctavian, tan per la EMA com per la FDA. El tractament consisteix en un AAV5 que conté el gen del factor VIII de coagulació, gen mutat en els pacients amb hemofília A per tal de poder controlar els sagnats. Es va observar que Roctavian era eficaç augmentant el nivell d'activitat del factor VIII i que aquest augment es va mantenir durant almenys 2 anys post administració del virus terapèutic. Aproximadament 3 mesos després del tractament, el 75,4% dels pacients tenien un nivell mitjà d'activitat del factor VIII, (l'hemofília lleu). A més, el nombre anual d'episodis hemorràgics va disminuir un 85,5% i la necessitat de tractament addicional de substitució del factor VIII es va reduir en un 97,5% ¹⁵⁴.

El medicament aprovat més recentment ha estat Hemgenix, a principis d'aquest any 2023. Hemgenix consisteix en una teràpia gènica, també amb un AAV5, per a la hemofília B, que també es un trastorn hemorràgic on les mutacions es localitzen en el factor de coagulació IX.

Hemgenix es va veure que reduïa les hemorràgies més eficaçment que la teràpia estàndard de substitució amb factor IX . La taxa de sagnat anual també es reduïa de 4,2 a 1,5 sagnats per any. El 96% dels pacients (52 de 54) ja no necessitaven de la teràpia de substitució amb factor IX almenys durant els 2 anys posteriors a la teràpia ¹⁵⁴.

2.Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat desenvolupar una estratègia de teràpia gènica per a l'acidúria glutàrica tipus 1 basada en l'administració d'un vector viral adenoassociat que transporta el gen *GCDH* i avaluar la seva eficàcia en un model murí de la malaltia (ratolins *Gcdh* ^{-/-}).

Objectius específics:

1. Determinar la capacitat de transducció dels vectors AAV-P-*GCDH* i AAV-*GCDH* en els teixits diana de AG1 després d'una administració sistèmica.
2. Avaluar la biodistribució i estabilitat del vector AAV-*GCDH* en ratolins *Gcdh* ^{-/-} quan s'administra a diferents edats del desenvolupament postnatal (P1, P15 i P30).
3. Avaluar la capacitat de transducció del vector AAV-*GCDH* quan s'administra per una via sistèmica (intravenosa) o locoregional (cisterna magna).
4. Analitzar els efectes de l'administració del vector AAV-*GCDH* a ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a una dieta estàndard o alta en lisina sobre el contingut de metabòlits i l'equilibri redox.
5. Estudiar els efectes de l'administració del vector AAV-*GCDH* sobre el fenotip neuropatològic.

3. Material I Mètodes

3.1. Tècniques de manipulació de bacteris

3.1.1. Soca bacteriana: DH5-alfa

Per al desenvolupament del present treball s'ha utilitzat la soca bacteriana d'*Escherichia coli* DH5-alfa. S'han utilitzat les cèl·lules termocompetents per a la transformació de plasmidis. Es tracta de bacteris recombinasa i endonucleasa negatius (recA1MUT; endAMUT) la membrana dels quals es torna inestable a 42°C.

Les cèl·lules DH5-alfa competents d'aquest treball van ser adquirides a través de Thermo Fisher Scientific.

3.1.1.1 Condicions de cultiu i emmagatzematge de DH5-alfa

Els bacteris DH5-alfa van ser cultivats a 37°C amb el medi de cultiu Luria Broth (LB) suplementat amb els antibiòtics corresponents en cada cas.

Els estocs bacterians es van emmagatzemar a -80°C en forma de glicerols (80% cultiu bacterià saturat + 20% glicerol).

3.1.2. Tècniques de manipulació bacteriana

3.1.2.1. Transformació de cèl·lules DH5-alfa

L'ADN plasmídic incorporat a les cèl·lules bacterianes es duplica alhora que ho fa l'ADN bacterià, de manera que la quantitat d'ADN plasmídic s'incrementa a mesura que les cèl·lules es divideixen. Segons aquest principi, i amb l'objectiu d'obtenir quantitats suficients dels plasmidis d'interès, es van transformar aquests en cèl·lules DH5-alfa.

El procés de transformació es va fer incubant els bacteris juntament amb l'ADN plasmídic durant 30 minuts en gel. Transcorregut aquest temps, els bacteris es van sotmetre a un xoc tèrmic a 42°C durant 20s, seguit d'una incubació de 2min en gel. Per tal de desestabilitzar la membrana cel·lular i permetre l'entrada del plasmidi a l'interior de les cèl·lules bacterianes. Tot seguit, es va recuperar el cultiu incubant-lo en agitació durant 1h a 37°C. Després de la recuperació del cultiu, aquest es va sembrar en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic corresponent per tal de seleccionar els bacteris transformats. És va deixar créixer unes 16h fins a l'obtenció de colònies.

3.2 Tècniques de manipulació del ADN

3.2.1. Aïllament i quantificació d'ADN

3.2.1.1. Aïllament d'ADN plasmídic de cèl·lules procariotes

L'ADN plasmídic bacterià de cèl·lules procariotes es va obtenir a partir de cultius bacterians pel mètode de lisi alcalina i mitjançant la precipitació en presència de sals i alcohol. La soca que conté el plasmidi d'interès es va aïllar o purificar a partir de cultius bacterians que provenien d'un glicerol o d'una placa. Aquests s'incubaven en agitació, a 37°C i en medi LB amb els antibiòtics corresponents fins a la saturació (aproximadament 16-20h).

En funció de la quantitat d'ADN plasmídic que es desitgés, es va realitzar un aïllament a petita escala (MiniPrep) o a gran escala (MaxiPrep).

3.2.1.1.1 Aïllament d'ADN a petita escala, MiniPreps

Aquest procediment permet obtenir petites quantitats d'ADN, entre 25 i 50µg a partir d'uns 2-4ml de cultiu bacterià.

Després d'arribar a saturació, les cèl·lules es precipiten per centrifugació a 6000g durant 5 min per obtenir el *pellet* bacterià. A continuació, es decanta el sobrenedant i es resuspèn el precipitat cel·lular en 200µl del tampó isotònic P1 que conté RNasa. Després, l'homogenat es sotmet a un procés de lisi alcalina mitjançant la solució P2. Transcorreguts 5min, la reacció de lisi és neutralitzada incubant la mostra amb 200µl de la solució P3 durant 20min en gel. A continuació, es centrifuga la mostra a 15000g durant 10 min per eliminar les restes cel·lulars i obtenir la fase aquosa que conté l'ADN plasmídic d'interès.

L'ADN plasmídic es precipita mitjançant l'agregació de 450µl d'isopropanol i es recupera per centrifugació, un altre cop a 1500g durant 10min. Posteriorment es renta amb etanol al 70% i el precipitat d'ADN es deixa assecar fins a eliminar completament la presència d'alcohol. Finalment, el precipitat es resuspèn en 30 µl d'aigua lliure de nucleases i es conserva congelat a -20°C.

Solució P1 – Tampó isotònic

Tris	50mM
EDTA	10mM

Solució P2 – Solució alcalina

NaOH	0,1M
SDS	1%

Solució P3 – Tampó àcid

Acetat potàssic	1,5mM
Àcid acètic	Fins a pH 5,5

3.2.1.1.2 Aïllament d'ADN a gran escala, MaxiPreps

Aquest protocol s'utilitza quan es vol obtenir ADN en gran quantitat (>100µg i d'una puresa elevada).

Depenent del número de còpies per bacteri del plasmidi (baix número de còpies o alt número de còpies) que es vol purificar es parteix de 250 o 500ml de cultiu saturat. L'aïllament d'ADN a gran escala es realitza de manera estandarditzada seguint el protocol corresponent al kit comercial de maxipreparació per a la filtració de plasmidis *PureLink™ HiPure* (Invitrogen). Aquest protocol segueix els mateixos principis descrits a l'apartat anterior.

3.2.2 Aïllament d'ADN viral de teixit

L'ADN viral es va obtenir dels teixits dels animals tractats. Es va dur a terme mitjançant una lisi cel·lular i una posterior extracció i precipitació.

El primer pas consisteix en la disgregació mecànica del teixit fins a obtenir una pols. Aquesta pols s'obté col·locant la mostra en un morter, aplicant de forma continuada nitrogen líquid per evitar-ne la descongelació, i efectuant pressió. Un cop obtinguda la pols, es resuspèn en 400µl de tampó de digestió seguit d'una agitació durant 1 min i posterior incubació de 12 a 18h a 55°C.

L'endemà, s'afegeixen 400µl de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1) i es barreja per inversió. Es centrifuga a 13000g durant 5 min per obtenir dues fases: l'orgànica que conté les proteïnes i l'aquosa que conté l'ADN. Es transfereix la fase aquosa a un nou tub, on se li afegeix 40µl d'acetat d'amoni 3M (o acetat sòdic) i 800µl d'etanol 100% fred, i es deixa precipitant durant 1h a -80°C.

Un cop a precipitat l'ADN, centrifuguem les mostres a 4°C durant 30min a 13000g i descartem el sobrenedant. Després per netejar el precipitat apliquem 400µl d'etanol 70% i tornem a centrifugar durant 5 min a 13000g. L'etanol es descarta i es deixa assecar la mostra. Finalment, es resuspèn en 50µl d'H₂O lliure de nucleases.

Tampó de digestió	
NaCl	100mM
Tris-HCl pH8.0	10mM
EDTA PH8.0	25mM
SDS	0,5%
Proteïnasa K	0,1mg/ml

3.2.3 Quantificació de l'ADN i determinació de la seva puresa

La quantificació de l'ADN obtingut d'una mostra i la seva puresa es va determinar mitjançant l'absorbància a 260nm i la posterior aplicació de la llei de Lambert-Beer ($C=A/\alpha l$). On A és l'absorbància, α és el coeficient d'extinció a 260nm ($0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i l és la distància de la trajectòria òptica (cm).

Es mesurava també l'absorbància a 280nm, longitud d'ona d'absorció de les proteïnes. De manera que la relació entre les absorbàncies (260/280) permetia saber la puresa de la mostra. Es considera una relació òptima quan la relació es de 1,8 o superior. Mentre que valors per sota de 1,7, determinen que hi ha contaminació per proteïnes o per solvents orgànics.

La relació d'absorbàncies 260/230 també es va tenir en compte com a mesura addicional de la puresa de l'ADN. Aquesta relació determina la contaminació per salts. Els valors dels àcids nucleics purs oscil·len entre 2 i 2,2.

Les quantificacions d'absorbància es van realitzar amb l'espectrofotòmetre *Nanodrop*TM (Thermo Scientific).

3.2.4 Digestió enzimàtica

L'ADN és susceptible de ser tallat mitjançant endonucleases bacterianes més comunament conegudes com enzims de restricció. Aquests són capaços de reconèixer seqüències específiques de nucleòtids d'ADN i trencar en aquests punts els enllaços fosfodièster de doble cadena, deixant així extrems roms o cohesius en funció del enzim que s'utilitza.

Les digestions es realitzen incubant l'ADN en presència de l'enzim corresponent a 37°C durant 1-16h, i amb el tampó enzimàtic indicat per la casa comercial en cada cas.

Reacció de digestió enzimàtica	
ADN	1µl (0,5-1µg/µl)
Tampó 10x (enzim específic)	2µl
Enzim	1µl (10U/µ)
Aigua lliure de nucleases	Fins a 20µl

El resultat de les restriccions es va comprovar mitjançant l'anàlisi del patró de bandes resultant de la digestió enzimàtica en gels d'agarosa. En funció de la mida específica de la seqüència d'ADN digerida, vam determinar si la reacció s'havia donat correctament. En el cas que el fragment es necessités per a altres tècniques, l'ADN era recuperat mitjançant el kit comercial d'extracció d'ADN en gel d'agarosa *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

Enzims de restricció

<u>Nom:</u>	<u>Casa comercial:</u>
-------------	------------------------

Sall	ThermoFisher
------	--------------

XbaI	ThermoFisher
------	--------------

HindIII	ThermoFisher
---------	--------------

3.2.5 Lligació

La lligació és el procés a través del qual dos fragments d'ADN de doble cadena, amb extrems roms o cohesius complementaris, s'uneixen entre si. Aquesta reacció és duta a terme per una ADN lligasa que, mitjançant l'ús d'ATP com a font d'energia, catalitza la formació d'un enllaç fosfodièster entre el grup 5' fosfat d'una cadena d'ADN i el grup 3' hidroxil de l'altra.

Les lligacions es van realitzar amb l'enzim *T4 DNA ligase* (Roche), seguint les indicacions del fabricant, a 4°C durant 16 h.

3.2.6 Tècniques d'amplificació de l'ADN

3.2.6.1 Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR)

La reacció en cadena de la polimerasa quantitativa permet determinar la quantitat d'un fragment de d'ADN específic que hi ha en una mostra. El fonament de la reacció de PCR es basa en que l'ADN-polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa) permet amplificar fragments d'ADN *in vitro* de manera específica amb l'ús d'encebadors, ja que pot treballar a altes temperatures (75°C-80°C).

Els encebadors són oligonucleòtids de 20-25 bases que hibriden per aparellament de bases complementàries als extrems 3' de la cadena d'ADN parental que es pretén amplificar (encebador directe i encebador revers). Actuen de punt d'ancoratge i inici de la polimerització que es duu a terme, mitjançant la incorporació de desoxiribonucleòtids (dNTPs).

La reacció de PCR consisteix en tres fases que es repeteixen diverses vegades (25-40) per tal d'amplificar de forma exponencial les cadenes d'ADN. Aquests són: la desnaturalització, la hibridació dels encebadors i l'elongació. A l'hora de dissenyar les condicions d'una PCR s'han de tenir dos factors en compte: la temperatura d'hibridació (T_h) i el temps d'elongació de les cadenes d'ADN (t_e).

- $T_h \rightarrow$ temperatura a la que els encebadors s'uniran de manera específica a la cadena d'ADN.
- $t_e \rightarrow$ dependrà de la mida del fragment que es vulgui amplificar (1min/kb d'ADN).

En el cas de la qPCR, el principi és el mateix que el de la PCR però en aquest cas s'hi afegeix un agent intercalant d'ADN que conté un fluorocrom. Aquest desprèn fluorescència quan es troba entre l'hèlix de doble cadena que forma l'ADN. De tal manera, que la fluorescència emesa per la mostra augmenta a mesura que es van donant els cicles d'amplificació. La quantificació es determina pel cicle de la qPCR en la que el nivell de fluorescència supera el llindar que s'ha establert prèviament.

En el cas del disseny d'encebadors per a la qPCR, s'ha de tenir en compte que no poden amplificar una regió més gran de 500 parells de bases (pb). Es considera la mida òptima uns 200pb.

Condicions de la qPCR

Desnaturalització inicial	95°C-10min
---------------------------	------------

40 cicles:

- Desnaturalització 95°C-10sec
- Hibridació T_h -30sec
- Elongació 72°C-20sec

Elongació final	72°C-10min
-----------------	------------

Les reaccions de qPCR es van dur a terme amb el reactiu comercial *LightCycler® 480 SYBR Green I Master*. Es van seguir les condicions del fabricant que van ser:

Master Mix

SYBR 2X	5µl
Encebadors 10µM (Directe i revers)	0,3µl
Aigua lliure de nucleases	3,7µl
Mostra d'ADN	1µl

El termociclador en el que van ser realitzades les quantificacions d'ADN és el *QuantStudio 7* (Applied Biosystems).

Encebadors

Set	Nom del encebador	Seqüència 5' → 3'	T_h
1	fwd ITR primer	GGAACCCCTAGTGATGGAGTT	56,2°C
	rev ITR primer	CGGCCTCAGTGAGCGA	57,7°C
2	Hprt1_Mm_2_Fw	CTCATGGACTGATTATGGACAGGA	56,8°C
	Hprt1_Mm_2_Rv	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	57,9°C

3.2.7 Generació del plasmidi d'expressió de la GCDH (pAAV-CA+GCDH)

En aquest treball es va generar un plasmidi d'expressió del gen *GCDH* (Figura 18), que va esdevenir el *backbone* del virus adenoassociat (AAV) amb el qual s'ha desenvolupat tot el projecte.

El cDNA del gen *GCDH* es va aïllar d'un plasmidi generat prèviament al laboratori, p72PGSmut3, per digestió amb els enzims *Sall* i *XbaI*. Posteriorment, el producte d'aquesta restricció, es va sembrar en un gel d'agarosa i sotmetre a un procés d'electroforesi que va permetre visualitzar dues bandes (una corresponent al fragment de la *GCDH* i l'altra a la resta del plasmidi). Aquest fragment de *GCDH* va ser purificat com s'especifica en el punt 3.2.4. D'altra banda, es va digerir el plasmidi PSP72 amb els mateixos enzims, *Sall* i *XbaI*, , per tal de poder-hi inserir el fragment de la *GCDH* mitjançant el procés de lligació.

Seguidament, el nou plasmidi generat pSP72 que contenia el cDNA de *GCDH* (pSP72+*GCDH*) va ser digerit amb l'enzim *HindIII* i introduït en el plasmidi adenoassociat pAAV-CA (Addgene, Plasmid #69616), prèviament obert per digestió amb *HindIII*. Finalment es va procedir a la lligació del cDNA *GCDH* en el plasmidi pAAV-CA generant el vector pAAV-CA+*GCDH*.

Les construccions es van transformar en cèl·lules DH5-alpha per tal d'amplificar els plasmidis i la seqüència final va ser comprovada mitjançant seqüenciació de Sanger (Eurofins Genomics).

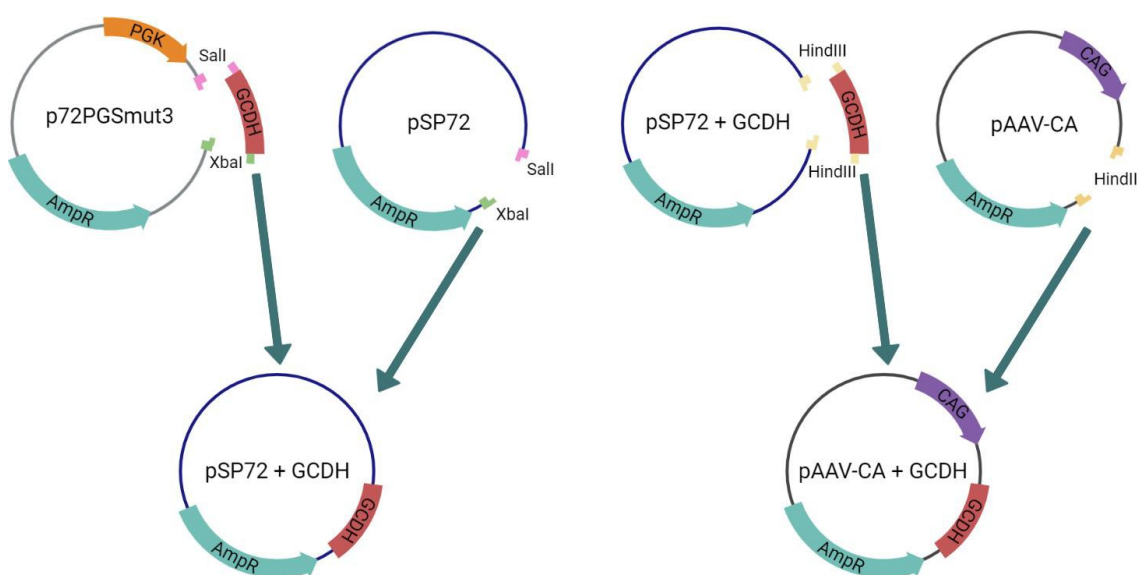


Figura 18: Esquema representatiu del procés de construcció del plasmidi d'expressió de *GCDH*.

3.2.8 Seqüenciació d'un fragment d'ADN

La seqüenciació de fragments d'ADN es va realitzar mitjançant el mètode de Sanger. Aquest mètode es basa en una reacció de PCR en la qual s'incorporen dideoxinucleòtids sense el grup hidroxil al carboni 3' i marcats amb fluoròfors específics per a cada una de les bases nucleotídiques seguint el patró del fragment d'ADN d'interès. La incorporació d'un d'aquests dideoxinucleòtids impedeix que la polimerització continuï. Això condueix a generar un conjunt de fragments d'ADN de diferents mides acabats en cadascuna de les bases del fragment d'interès. Aquest patró de bandes, mitjançant la detecció de fluorescència, dona lloc a la seqüència nucleotídica del fragment d'ADN d'interès.

Les seqüenciacions d'ADN en aquest projecte van ser realitzades pel servei de seqüenciació de l'empresa *Eurofins Genomics*. Als quals se'ls envià les mostres d'ADN i els encebadors corresponents en les condicions requerides per l'empresa.

Encebadors			
Set	Nom del encebador	Seqüència 5' → 3'	T _h
1	pBR322ori F	GGGAAACGCCTGGTATCTTT	55,1°C
	F1ori-R	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAG	54,7°C
2	pAAV-CA Seq FW	CACTGAGATTACCCTGGGCCTT	54,5°C
	pAAV-CA Seq RV	CAACGGGCCACAACCTCCTCATA	54,5°C

3.3 Tècniques de manipulació de proteïnes

3.3.1 Aïllament de proteïnes

L'extracció de proteïnes de les mostres es va dur a terme a partir d'un lisat cel·lular de teixit. Primer es va realitzar una disgregació mecànica de teixit congelat per a obtenir pols. Es realitza col·locant la mostra en un morter, aplicant nitrogen líquid per evitar-ne la descongelació, i es va efectuant pressió fins a obtenir-la. Després es procedeix a homogeneïtzar les mostres amb el tampó de lisi i un cop homogeneïtzades, s'incuben a 98°C durant 10 min. Posteriorment es centrifuguen a 16.000g durant 5 min per eliminar les restes cel·lulars i obtenir el sobrenedant amb les proteïnes.

Tampó de lisi	
Tris HCl pH 6,8	50mM
SDS	2%
Glicerol	10%
<i>Complete Mini Protease Inhibitor</i> 10x (Roche)	1%

3.3.2 Quantificació de proteïnes

La quantificació de les proteïnes es va dur a terme amb el kit comercial *BCA Protein Assay* (ThermoFisher Scientific). Consisteix en un assaig colorimètric a través del qual es mesura la reducció del coure (Cu^{2+} a Cu^{1+}) en un medi alcalí mediat pels enllaços peptídics de les proteïnes. La detecció colorimètrica s'esdevé perquè l'àcid bicinconínic s'uneix a Cu^{1+} i es produeix un canvi de color en la mostra.

Per determinar la concentració proteica, s'obtenen els valors d'absorbància a una longitud d'ona de 562nm. El valor d'absorbància s'extrapola en una recta patró de concentracions creixents d'albúmina sèrica bovina. La lectura de les absorbàncies es realitza en un espectrofotòmetre (*Synergy HT* – BioTek).

3.3.3 Western Blot

El Western Blot és una tècnica utilitzada per la identificació de proteïnes on hi ha una primera part de separació per electroforesis per pes molecular, i una posterior de detecció per un anticòs específic que reconeix la proteïna d'interès. La tècnica consisteix en tres fases: una primera electroforesis en condicions desnaturalitzants, una segona fase de transferència a una membrana i una última fase d'immunodetecció.

3.3.3.1 Electroforesi en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi de les mostres de proteïnes es va realitzar en gels de poliacrilamida en presència d'agents desnaturalitzants, com el SDS i el DTT. En el cas del SDS és un detergent que trobem tant en el tampó de càrrega de les proteïnes, com en el gel i en el tampó d'electroforesi. La seva funció és la de desnaturalitzar les proteïnes trencant els enllaços covalents i per altra banda, proporciona una càrrega negativa uniforme a totes les proteïnes. D'aquesta manera el procés de separació electroforètica serà únicament per mida i la càrrega no afectarà. El DTT és un agent reductor que el que fa és trencar els ponts disulfur, de manera que desestructura les proteïnes per tal de que la conformació no afecti a la separació.

Tampó de càrrega 6x		Tampó d'electroforesi	
Tris base	300mM	Tris base	3g
SDS	12%	SDS	1g
DTT	600mM	Glicina	14,4g
Blau de bromofenol	0,6%	Aigua destil·lada	1L
Glicerol	60%		

Les proteïnes corren a través dels gels de poliacrilamida, que consten de dues parts. Un primer gel, que actua com a concentrador i té un percentatge més baix d'acrilamida (4%). Permet el alineament de les proteïnes per tal de que quan entrin al segon gel estiguin totes a la mateixa alçada. El segon gel és el gel separador, que com el seu nom indica el que fa és separar les proteïnes per mida. A més a més afavoreix la migració de les molècules petites i alenteix la de les que són més grans. El percentatge d'acrilamida del gel separador es tria en funció dels KDa de pes de la proteïna d'interès. A menys pes, més alt és el percentatge de acrilamida al que s'ha de realitzar el gel.

Gel concentrador 4%		Gel separador 10%	
Acrilamida 30% (37:5:1)	650µl	Acrilamida 30% (37:5:1)	3ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,25ml	Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5ml
SDS 10%	50ul	SDS 10%	100ul
Aigua	3ml	Aigua	4ml
APS 10%	50µl	APS 10%	100µl
TEMED	10µl	TEMED	10µl

Es van carregar uns 80µg de proteïna en les mostres de fetge i ronyó, i uns 100 µg d'escorça i estriat. Es van preparar en tampó de càrrega 6x, i carregar al gel d'acrilamida, submergit en el tampó d'electroforesi. Les proteïnes van migrar cap al pol positiu, gràcies a la càrrega negativa proporcionada pel SDS. Per a realitzar la separació completa d'aquestes, es va sotmetre aquest gel carregat i submergit en tampó a un camp elèctric de 100 volts durant aproximadament 2h.

3.3.3.2 Transferència a membrana

Una vegada realitzada l'electroforesi, es transfereixen les proteïnes a una membrana per poder realitzar la immunodetecció de les proteïnes d'interès a través dels anticossos. Per a la transferència es van utilitzar membranes de PVDF *Immunobilon® Transfer Membranes* (Merck Millipore Ltd).

Les proteïnes són transferides a la membrana per migració d'un camp elèctric de 400mA durant 1h. Es col·loca la membrana entre el gel i el pol positiu, per tal de que migrin per càrrega en una solució tampó de transferència.

Tampó de transferència	
Tris Base	3g
Glicina	48g
Aigua destil·lada	1L

3.3.3.3 Immunodetecció de les proteïnes

Per a la detecció de les diferents proteïnes d'interès de la membrana s'utilitzen anticossos contra epítops específics de cadascuna d'aquestes. Per tal d'evitar que succeeixin unions inespecífiques, prèviament es duu a terme una incubació d'1h a temperatura ambient en solució de bloqueig (TBS-T amb llet desnatada en pols al 10%). Seguidament es procedeix a la incubació amb l'anticòs primari específic (amb la seva dilució determinada en TBS-T amb llet al 5%) durant 1h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.

Després d'eliminar l'excés d'anticòs amb un rentat en TBS-T durant 10 min, les membranes s'incuben amb el corresponent anticòs secundari (marcat amb peroxidasa de rave) en la seva dilució determinada, durant 1h a temperatura ambient. Posteriorment, es renta la membrana durant 5 min en TBS-T per eliminar l'excés d'anticòs secundari.

Tampó TBS-T	
Tris-HCl pH7.5	10mM
NaCl	100mM
Tween®20	0,1%

Finalment, es realitza la immunodetecció revelant amb el kit *Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Science) que conté peròxid d'hidrogen i luminol. En la reacció del revelat, la peroxidasa conjugada amb el anticòs secundari promou l'oxidació del luminol al degradar el peròxid d'oxigen. Aquesta reacció produeix quimioluminescència que és detectada amb el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

Anticòs	Casa Comercial	Referència	Mida molecular	Dilució	Condicions d'hibridació
Anticossos Primaris					
Anti-GCDH	Sigma-Aldrich	AV43559	48 KDa	Escorça i Estriat	Tota la nit 4°C
				1:500	
				Fetge i Ronyó	
Anti-GAPDH	Merck Millipore	ABS16	36KDa	1:1000	1h Temperatura ambient
				1:2000	
Anticossos secundaris					
Polyclonal goat anti-rabbit Immunoglobulin HRP-conjugated					
	Dako	P0448		1:2000	1h Temperatura ambient

3.3.3.4 Quantificació de les bandes d'immunodetecció

La intensitat de les bandes detectades de les proteïnes d'interès va quantificar-se per densitometria amb el programa informàtic ImageJ. En tots els casos els valors d'intensitat de la banda d'interès es van relativitzar al valor d'intensitat de la banda control (GAPDH) de la mostra corresponent.

3.3.4 Activitat en gel

L'activitat GCDH es va analitzar mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives (BN-PAGE). El fetge i l'estriat dels ratolins es van homogeneïtzar en tampó mannitol de lisi en gel. Els homogenats de teixit es van centrifugar dues vegades a 650 g durant 20 min a 4 °C per eliminar les restes cel·lulars i els nuclis. La concentració de proteïnes es va determinar mitjançant un assaig de *BCA Protein Assay* (ThermoFisher Scientific) explicat prèviament. Les fraccions enriquides amb mitocondris es van obtenir a partir de 1500 µg de proteïnes del homogenat de fetge i 1000 µg de proteïna d'estriat per centrifugació (10,000g 10 minuts a 4°C). Els pellets enriquits amb mitocondris es van solubilitzar amb una solució i les mostres es van carregar i separar en gels de gradient de poliacrilamida del 4% al 20% en condicions natives. L'activitat GCDH es va visualitzar mitjançant un assaig d'activitat en gel, incubant el gel en un tampó d'activitat a 37 °C durant tota la nit.

Tampó mannitol de lisi		Solució solubilitzadora	
Mannitol	225mM	Bis-Tris	50mM
Sacarosa	75mM	EDTA	0,5mM
Tris-HCl	10mM	Àcid aminocaproic	750mM
EDTA	0,1mM	N-Dodecil-beta-Maltosida	2%

Tampó d'activitat

Tampó fosfat	50mM
Glutaril CoA	200µM
FAD	1,5µM
NBT	2mg/ml

Les anàlisi de l'activitat en gel van ser realitzats per la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme de l'Hospital Clínic.

3.4 Assajos funcionals

3.4.1 Peroxidació lipídica

El malondialdehid (MDA) és un dels productes finals que es formen durant la descomposició d'alguns productes derivats de la peroxidació lipídica. Per tant, la peroxidació dels àcids grassos poliinsaturats és una important mesura de la toxicitat de l'oxigen en els sistemes biològics. Així que, els nivells de MDA ens indiquen el grau de lesió oxidativa en les membranes cel·lulars.

La peroxidació lipídica es va mesurar com a indicador del dany oxidatiu a les membranes lipídiques utilitzant l'assaig *BIOXYTECH-LPO-586™* (*Oxis International Inc*) mitjançant la mesura espectrofotomètrica dels nivells de malondialdehid (MDA).

Els resultats es van expressar com a concentració en micromol de MDA per mil·ligram de proteïna ($\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteïna).

3.4.2 GSH

El glutatió (GSH) és un tripèptid que conté L-cisteïna, àcid L-glutàmic i glicina. És la molècula de proteïna tiol intracel·lular més petita de les cèl·lules, que protegeix el dany cel·lular causat per espècies reactives d'oxigen com els radicals lliures i els peròxids. Quan les cèl·lules estan exposades a nivells més elevats d'estrès oxidatiu, s'ha observat que hi ha una disminució dels nivells de glutatió. Per tal de mesurar el nivells de glutatió es va utilitzar el kit *GSH Detection Assay Kit (Fluorometric - Green)* (*Abcam*).

Els resultats es van expressar com a concentració en micromol de GSH per mil·ligram de proteïna ($\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteïna).

3.5 Tècniques de manipulació d'animals

Tots els protocols i procediments de manipulació animal realitzats en aquest treball van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEAA) de la Universitat de Barcelona i el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. En tot moment s'han seguit les directrius de la Unió Europea per la correcta cura i manipulació dels animals de laboratori 86/609/EEC.

Els animals utilitzats en aquest estudi van ser ratolins d'entre 1 dia i 6 mesos de vida de dues soques diferents: la soca C57Bl/6J adquirida a ENVIGO i la soca B6.129S4-Gcdhtm1Dmk/Mmnc (homozigot knock-out per a la Gcdh) obtinguda del Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC) de la Universitat de Carolina del Nord. Tots els animals van ser estabulats a l'estabulari SPF (*Specific Pathogen Free*) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. L'estabulació es va dur a terme en un ambient amb condicions controlades de: gàbies de plàstic (màxim 5 animals per gàbia), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humitat (60%), cicle de llum-fosc de 12h amb aigua i menjar *ad libitum*. Els ratolins van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard (SD) o una dieta alta en lisina (HLD) 4,7% . Els animals van començar la dieta HLD en el deslletament a les 3 setmanes de vida o a les 5 setmanes.

La dieta alta en lisina (HLD) al 4.7% va ser preparada per la empresa ENVIGO.

3.5.1 Administració de AAVs *in vivo*.

3.5.1.1 Administració sistèmica per via intravenosa

L'administració de virus per via sanguínia es va realitzar en 3 edats diferents del estadi del desenvolupament del ratolí: P1 en període neonatal, P15 període postnatal primerenc, P30 període adult-jove. En els tres estadis la dosi que es va administrar va ser $1\cdot 10^{11}\text{vp/ratolí}$, que en el cas de P1 es va diluir en solució salina fins al volum final d'administració de 30 μl , i en el cas de P15 i P30, fins a 50 μl .

Les partícules virals van ser produïdes a la Unitat de Producció de Vectors (UPV) del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) amb una titulació de entre $3 \cdot 10^{12}$ - $1 \cdot 10^{13}$ vp/ml. On també es va realitzar la producció d'un AAV control que no contenia el transgen de la GCDH (titulació de $2,72 \cdot 10^{13}$ vp/ml).

3.5.1.1.1 Administració sistèmica per via intravenosa a P1

L'administració neonatal (P1) es realitza a la vena temporal. Per dur a terme aquesta administració, es col·loca la cria de ratolí sobre paper d'alumini en gel sec durant 30-60 segons per anestesiar l'animal. Quan l'animal està completament adormit i no hi ha pràcticament moviment, es trasllada sota un estereoscopi. Un cop allà, es posiciona de costat. Seguidament, es col·loca el dit mig esquerre de l'operador just darrera l'orella de l'animal. Al morro del cadell s'hi col·loca el polze de la mateixa mà i el dit índex esquerre davant l'orella. De manera que l'orella quedi entre els dits índex i mig per tal d'immobilitzar l'animal. S'estira la pell amb el dit índex cap enrere per tal d'exposar la vena temporal. Aquesta s'identifica a la part anterior de l'orella i amb una agulla de 30G s'administra el virus.

S'espera a que la cria es recuperi i adquireixi calor, durant 2-3 minuts, de manera que es restableixi el moviment i es retorna a la gàbia amb els seus progenitors. Al col·locar-lo, cal assegurar-se que la cria estigui recoberta amb el material del niu per garantir la re-acceptació per part dels progenitors.

3.5.1.1.2 Administració sistèmica per via intravenosa a P15 i P30.

L'administració tan a P15 com a P30 es va realitzar per injecció a la vena lateral de la cua amb una agulla de 30G i 29G respectivament. Per a dur a terme l'administració, es va immobilitzar l'animal en un *restrainer* i se li va aplicar calor per tal de vasodilatar la vena.

3.5.1.2 Administració per via Cisterna Magna

Per a l'administració via Cisterna Magna es van utilitzar ratolins de 15 dies (P15) i 30 dies (P30) d'edat. Aquest procediment requereix d'anestesia amb una fase d'inducció de 4% d'isofluorà i una fase de manteniment del 2,5% d'isofluorà. Seguidament es procedeix a rasurar la part posterior del cap i s'esterilitza la pell amb alcohol del 96%. A continuació es procedeix a inclinar lleugerament el cap de manera que formi un angle de 120° amb el cos per tal d'exposar al màxim la Cisterna Magna.

Posteriorment s'aixeca la pell amb unes pinces i es realitza una incisió des de l'alçada de la cresta occipital fins al clatell de l'animal d'aproximadament d'1 cm, al llarg de la línia mitjana. Es localitza la Cisterna Magna en la part més posterior de la línia mitjana i es procedeix a injectar el virus prèviament carregat en una agulla Hamilton de 10 µl (màxim volum d'injecció). Finalment es procedeix a unir la incisió amb cola quirúrgica, es retorna l'animal a la gàbia i s'espera a que es recuperi de l'anestesia.

3.5.2 MRI.

Els experiments de ressonància magnètica es van realitzar en una cohort de 24 ratolins distribuïts en 4 grups experimentals: WT (n=6); KO dieta estàndard (n=6); KO dieta HLD (n=6) i KO HLD i AAV-GCDH (n=6).

Les adquisicions de ressonància magnètica es van realitzar en un escàner d'animals horitzontal BioSpec 70/30 7.0T (*Bruker BioSpin*, Ettlingen, Alemanya), equipat amb un sistema de gradient protegit activament (400 mT/m, 12 cm de diàmetre interior). El protocol d'adquisició d'espectroscòpia de ressonància magnètica (MRS) aplicat va permetre la mesura de metabòlits en el nucli estriat i l'anàlisi d'imatge ponderada per difusió (DWI).

L'anàlisi es va realitzar a la Unitat Experimental 7T de ressonància magnètica de l'IDIBAPS.

3.5.3 Obtenció d'òrgans i teixits murins.

3.5.3.1 Extracció de sang i obtenció de sèrum

L'extracció de petits volums de sang es va realitzar amb microcapil·lars a través del tall de la cua del ratolí, que per facilitar el procediment estava immobilitzat en un *restrainer*.

L'extracció de grans volums de sang es va dur a terme per punció intracardíaca amb una agulla de 29G en animals anestesiats al 3% d'isofluorà. Un cop finalitzada l'extracció, es realitzava l'eutanàsia de l'animal per dislocació cervical.

A continuació, la sang obtinguda es centrifugava a 3500rpm durant 15 minuts i el sèrum obtingut es transferia a un tub nou i era guardat a -80°C fins al seu anàlisi.

3.5.3.2 Extracció d'òrgans sòlids

Els animals es sacrificaven per dislocació cervical. Posteriorment es procedia a l'obtenció dels òrgans per resecció quirúrgica: escorça cerebral, nucli estriat, fetge i ronyons. Els òrgans eren immediatament emmagatzemats en tubs i congelats en nitrogen líquid. Les mostres es conservaven a -80°C fins al seu anàlisi.

3.5.3.3 Preparació dels homogenats de teixit

En un tub de 2ml es van afegir 350µl de tampó mannitol fred (4°C) i un fragment de teixit d'uns 20-50mg. Seguidament es va procedir a homogeneïtzar la mostra en fred (0-6°C) amb un homogeneïtzador a 800rpm. La solució havia de ser homogènia i no es passava per l'èmbol motoritzat més de 15 vegades.

Un cop homogeneïtzada la mostra, es transferia tot el volum a un tub de 1,5ml, es centrifugava a 650g a 4°C durant 10 min i el sobrenedant es transferia a un tub de 1,5ml nou. El pellet es resuspensia amb 100µl de tampó mannitol en el cas de l'escorça i el estriat, i amb 200µl en el cas de fetge i ronyó. Es tornava a homogeneïtzar i centrifugar, i el sobrenedant s'unia a l'anterior.

La concentració de proteïnes es va determinar mitjançant un assaig de *BCA Protein Assay* (ThermoFisher Scientific) explicat prèviament i les mostres així preparades eren emmagatzemades a -80°C.

Tampó Mannitol pH 7,2	
Mannitol	225mM
Sucrosa	75mM
Tris HCl	10mM
EDTA	0,1mM

3.5.3.4 Anàlisi bioquímica del sèrum i òrgans sòlids.

Es van analitzar els nivells de glutarilcarnitina (C5DC) , d'àcid glutàric (GA) i àcid 3-hidroxiglutàric (3-OH-GA) en sèrum, i en extractes de fetge, estriat i escorça.

La glutarilcarnitina es va extreure dels sèrums i de les mostres de teixits homogeneïtzades amb un dissolvent orgànic que contenia acilcarnitines deuterades utilitzades com a estàndards interns en ambos tipus de mostra (kit *NeoBase 1*, Perkin Elmer). El producte extret es va assecar i es va reconstituir en metanol/H₂O (75/25). En el cas de mostres de teixit neurològic, el producte sec extret es va derivatitzar amb n-butanol/HCl 3N, es va assecar en nitrogen i es va reconstituir en metanol/H₂O (75/25). A continuació, l'anàlisi es va realitzar mitjançant el sistema ACQUITY UPLC (*I-Class*, Waters, MA, EUA)-XevoTQD en mode MRM, i amb infusió directa mitjançant la fase mòbil inclosa al kit *Neobase 1*. La quantificació es va fer amb *Neolynx Software* (Waters).

Per a l'anàlisi d'àcid glutàric i d'àcid 3-hidroxiglutàric, en els homogenats es va afegir una solució aquosa que contenia els estàndards interns marcats amb deuteri (àcid glutàric-d₄ i àcid 3-hidroxiglutàric-d₅). Els compostos es van extreure mitjançant una placa Oasis HLB de 96 pous (60 mg d'absorbent) i es van eluir amb una fase d'acetonitril/metanol (90/10), després d'afegir àcid fòrmic al 0,4% per tal de facilitar la ionització. La separació cromatogràfica es va realitzar en un sistema ACQUITY UPLC (*I-Class*, Waters, MA, EUA)-XevoTQS amb una columna ACQUITY Premier BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm). El cabal es va establir a 320 µL min⁻¹ mitjançant una barreja binària de dissolvent A (aigua amb àcid fòrmic al 0,1%) i dissolvent B (metanol amb àcid fòrmic al 0,1%). Els valors es van quantificar amb el programari *Targetlynx* (Walters) mitjançant una corba de calibratge i es van normalitzar pel contingut de proteïnes.

Les anàlisi bioquímiques dels sèrums i dels homogenats dels teixits van ser realitzats per la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme de l'Hospital Clínic.

3.6 Tècniques histològiques

3.6.1 Preparació del teixit i obtenció de seccions de cervells per a l'anàlisi histològica

Els cervells per a les tincions histològiques es van obtenir després de la fixació del teixit mitjançant perfusió. En aquest cas, els ratolins s'adormien amb isofluorà al 3% i s'immobilitzaven exposant la cavitat toràctica cara amunt. Es continuava amb una incisió des de l'estèrnum cap a ambdós costats fins al lateral de l'animal. S'obria el diafragma, i s'exposava el cor. Amb una palometa d'infusió es penetrava al ventricle esquerra, i es realitzava una secció a l'aurícula dreta. Amb una xeringa s'introduïa 20ml de PBS per netejar de sang el teixit i seguidament es canviava per 20ml de paraformaldehid al 4% (per fixar el cervell). Aquesta administració del PBS i del PFA es realitzava a una velocitat constant d'1ml/5s. Finalment s'extreia el cervell de la cavitat cranial, es mantenia en paraformaldehid al 4% a 4°C durant 24h i posteriorment en PBS a 4°C fins a la seva inclusió en parafina.

La inclusió en blocs de parafina va ser realitzada per la plataforma del Servei de Biobanc del Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS.

Es van obtenir talls coronals en seccions de 4 µm de tres profunditats diferents dels cervells inclosos en els blocs de parafina .

Els talls histològics van ser realitzats per la plataforma del Servei de Biobanc del Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS.

3.6.2 Tincions generals

Les tincions generals es basen en la utilització de colorants per tenyir les diferents estructures que hi ha als teixits. En aquest tipus de tincions hi ha dos components principalment que actuen a nivell molecular: els colorants que tenen un component responsable de l'aportació de color (cromogen), i els que permeten la unió a les diferents estructures tissulars en funció de la naturalesa química (auxocrom).

3.6.2.1 Hematoxilina - Eosina

Aquesta tinció es basa en l'ús d'un colorant bàsic (hematoxilina) i un colorant àcid (eosina). L'hematoxilina té afinitat per les estructures àcides cel·lulars, de manera que s'uneix fortament a les molècules d'ADN fent així que els nuclis cel·lulars es tenyeixen de color morat. En canvi, l'eosina té afinitat per estructures bàsiques com el citoplasma cel·lular, que adquireix un color rosat.

Les tincions d'hematoxilina-eosina van ser realitzades per la plataforma del Servei del Biobanc de l'Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS.

3.6.3 Immunohistoquímica sobre seccions de cervell de ratolí

Les tincions específiques permeten la detecció de components concrets o d'interès del teixit que es vol estudiar. Aquestes tincions es realitzen mitjançant l'ús d'anticossos d'unió a proteïnes específiques.

Es va dur a terme la immunodetecció de les proteïnes GFAP, MBP i NeuN en les seccions de cervell seguint el protocol estàndard d'immunohistoquímica.

3.6.3.1 Desparafinat i hidratació

Els talls histològics es van desparafinar i hidratar per immersió durant 10 minuts en les següents solucions:

- Xilol I; Xilol II; Xilol III; Etanol 100% I ; Etanol 100% II; Etanol 96%; Etanol 70%; Etanol 50%; Aigua destil·lada.

3.6.2.1.2 Recuperació antigènica

La fixació del teixit amb paraformaldehid així com la seva inclusió en parafina pot alterar l'estructura proteica de moltes de les proteïnes del teixit i comportar que determinats antigens perdin la seva reactivitat immunogènica. Per tal de restaurar la conformació dels epítops es realitzà un procés de recuperació antigènica. Per dur a terme aquesta recuperació es varen bullir les mostres en una olla a pressió amb solució tampó citrat durant 5'. Transcorregut aquest temps les mostres es van deixar temperar en PBS 1X.

Solució tampó citrat	
<i>Citrate buffer pH 6, 10x antigen retrieval (Sigma)</i>	200ml
Aigua destil·lada	1800ml

3.6.2.1.3 Bloqueig, permeabilització i anticòs primari

Per evitar el marcatge inespecífic d'altres proteïnes, les mostres es van incubar amb una solució de bloqueig rica en albúmina que permet saturar els possibles llocs d'unió inespecífica. De manera que s'incubaren les mostres (100µl per tall histològic) amb aquesta solució durant 1,5h en una cambra humidificada. Un cop ha finalitzat el bloqueig es van realitzar tres rentats de 5 min en PBS 1x abans de passar al següent pas.

Solució de bloqueig	
Tritó X-100	0,3%
BSA	1%
FBS	10%
PBS	1X

3.6.2.1.4 Marcatge

El marcatge o detecció dels diferents proteïnes d'interès es va dur a terme mitjançant incubació amb els anticossos específics diluïts en PBS – 0,1% de BSA durant tota la nit a 4°C.

Anticòs	Casa Comercial	Referència	Dilució
Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) antibody	Sigma-Aldrich	G3893	1:800
Purified anti-Myelin Basic Protein Antibody	BioLegend	836504	1:1200
Anti-NeuN Antibody, clone A60	Sigma-Aldrich	MAB377	1:12000

3.6.2.1.5 Bloqueig de les peroxidases endògenes i revelat

Abans de procedir al bloqueig de les peroxidases, es va tornar a realitzar 3 rentats de 5 min amb PBS 1x per tal d'eliminar l'anticòs sobrant de les mostres. Aquest bloqueig de les peroxidases endògenes es realitza per evitar el marcatge inespecífic en els talls histològics. El bloqueig es va realitzar incubant les seccions durant 10 min amb un reactiu de bloqueig comercial (Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent, Agilent). A continuació, es va dur a terme el revelat de la reacció mitjançant el kit Dako EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako) seguint les indicacions del fabricant. Després del revelat, les mostres es van contratenyir amb hematoxilina.

3.6.2.1.6 Deshidratació i muntatge

El deshidratat de les seccions es va realitzar per immersió durant 5' a la següent bateria de solucions:

- Etanol 100% I; Etanol 100% II; Etanol 100% III; Xilol I; Xilol II; Xilol III

Finalment, es van deixar assecar les mostres i es va procedir a realitzar el muntatge de les mostres amb medi de muntatge DPX *mountant for histology* (Sigma-Aldrich).

3.6.4 Anàlisi i quantificació d'histologies

L'anàlisi i la quantificació dels talls histològics es va dur a terme mitjançant el programa QuPath-0.3.0. Per quantificar els marcatges, es va seleccionar la regió d'interès, es van ajustar els paràmetres òptims al programa i es va procedir a la detecció per contrast. Per a cada marcatge totes les imatges van ser processades en les mateixes condicions.

Els valors es representen en % d'àrea de vacuoles, % de cèl·lules positives per GFAP i % d'àrea tenyida per MBP i nombre de cèl·lules per mm² per NeuN.

3.7 Anàlisi estadística i representació gràfica

Les dades experimentals han estat representades per la mitjana $\pm$ SEM (error estàndard mig) en gràfics que contenen representacions de diversos experiments independents. L'anàlisi estadística i la representació gràfica de les dades es va realitzar amb el programa GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad Software).

Les diferències estadístiques es van avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney que és un test no paramètric que compara dos grups no aparellats. Aquesta prova es basa en classificar primer tots els valors de baix a alt, sense prestar atenció a quin grup pertany cada valor. El nombre més petit obté un rang d'1. El nombre més gran obté un rang de n, on n és el nombre total de valors dels dos grups. A continuació, es fa una mitjana de les classificacions de cada grup. Si les mitjanes dels rangs dels dos grups són molt diferents, el valor p serà petit.

La supervivència dels ratolins es va analitzar pel mètode Kaplan-Meier i es va avaluar amb una prova de rang llarg (Mantel-Cox).

Les diferències es van considerar estadísticament significatives (*) quan el valor $p \leq 0,05$ i altament estadísticament significatiu (**) quan el valor $p \leq 0,01$, (***) quan el valor $p \leq 0,001$ i (****) quan el valor $p \leq 0,0001$.

4. Resultats

4.1 Anàlisi de la capacitat dels vectors AAV-P-*GCDH* i AAV-*GCDH* de transduir els teixits diana de AG1 i avaluació dels seus efectes sobre el contingut de C5DC en ratolins *Gcdh* $-/-$.

4.1.1 Construcció dels vectors AAV-P-*GCDH* i AAV-*GCDH*.

Amb la finalitat de disposar d'un vector terapèutic capaç de dirigir l'expressió del gen *GCDH* als teixits diana de forma eficient, es van construir dos vectors adenoassociats basats en el serotip 9, on el gen de la *GCDH* era regulat per dos promotors diferents.

Es va seleccionar el serotip 9 dels AAVs, tenint en compte que la deficiència de GCDH condueix principalment a alteracions neuropatològiques, i que el AAV9 s'ha descrit amb capacitat de transduir al sistema nerviós central (SNC) i de creuar la barrera hematoencefàlica després d'una administració sistèmica ^{155,156}.

Com a promotors es varen escollir d'una banda el promotor de la fosfoglicerat quinasa (PGK), amb capacitat d'induir l'expressió dels transgens de forma lleu ¹⁵⁷. I es va generar el vector AAV-P-*GCDH* (Figura 19A). Es tracta d'un vector de cadena simple que conté el promotor PGK, el cDNA de la *GCDH* humana, i una senyal de cua poli(A) del virus simi 40 (SV40) flanquejat per les seqüències ITR. Les ITR contenen una sèrie d'elements d'acció en *cis* que estan implicats en l'inici de la replicació de l'ADN viral, en l'empaquetament de l'ADN en la càpside i tenen la capacitat de conferir persistència als genomes de l'AAV després de la infecció ¹⁵⁸.

D'altra banda, es va construir un segon vector, utilitzant el promotor quimèric CAG, descrit com a promotor fort, capaç de donar lloc a nivells alts d'expressió dels transgens que controla ¹⁵⁹. El promotor CAG conté una seqüència *enhancer* del citomegalovirus (CMV), part del promotor de la β -actina de pollastre i l'intró de la β -globina de conill. Amb aquest promotor es va generar el vector que anomenem AAV-*GCDH* (Figura 19B).

El vector de cadena simple AAV-*GCDH* generat, contenia un cassat d'expressió que estava format, de 5' a 3', per el promotor quimèric CAG que regula la seqüència del cDNA de la *GCDH* humana, seguit d'un element regulador post transcripcional anomenat WPRE que prové del WHV (virus de l'hepatitis de la marmota), que estabilitza i millora l'expressió del transgèn i d'una senyal de poliadenilació (poli(A)) de l'hormona del creixement humà. El cassat d'expressió del AAV-*GCDH* esta flanquejat per seqüències de repetició terminal invertida (ITR).

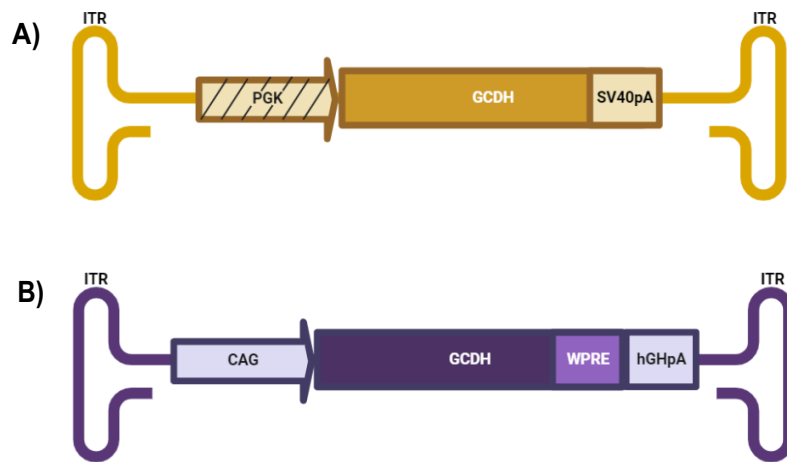


Figura 19. Esquema dels vectors terapèutics que contenen el gen de la *GCDH*.

- A)** Vector AAV-P-*GCDH*: conté el gen *GCDH* humà sota el control del promotor PGK.
- B)** Vector AAV-*GCDH*: conté el gen *GCDH* humà sota el control del promotor CAG.

4.1.2 Anàlisi de la transducció i efectes sobre el contingut de CD5C en els teixits diana.

Per tal d'estudiar la capacitat dels vectors generats de vehicular l'expressió del transgèn *GCDH* als teixits diana es varen injectar per via intravenosa ratolins *Gcdh* ^{-/-} adults joves amb els vectors AAV-P-*GCDH* o AAV-*GCDH*, a la dosi de 1×10^{11} genomes/ratolí (Figura 20). Dues setmanes després es va procedir a analitzar l'expressió de la proteïna GCDH i el contingut del metabòlit glutarilcarnitina (C5DC).

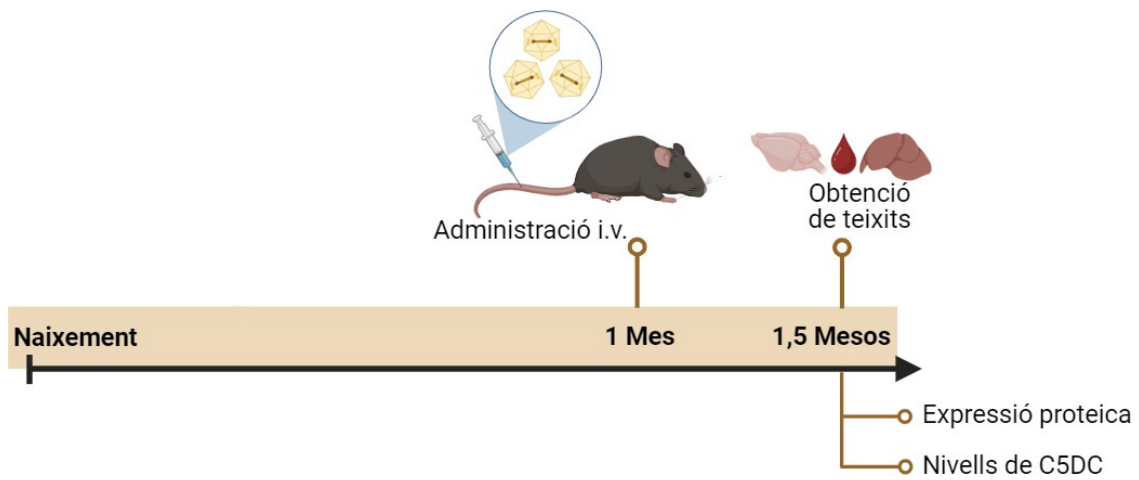


Figura 20. Esquema representatiu del procediment experimental.

Administració dels vectors AAV-P-GCDH o AAV-GCDH a ratolins d'un mes d'edat (dosi 1×10^{11} genomes virals /ratolí). Obtenció i anàlisi dels teixits a les 2 setmanes post-administració.

Es va observar que ambdós vectors eren capaços de transduir el fetge donant lloc a l'expressió de GCDH en tots els animals injectats, essent aquesta superior en els animals que van rebre el vector AAV-GCDH i assolint nivells similars als dels ratolins control. En cervell, en canvi, l'expressió de GCDH es va detectar únicament en els animals tractats amb AAV-GCDH (Figura 21).

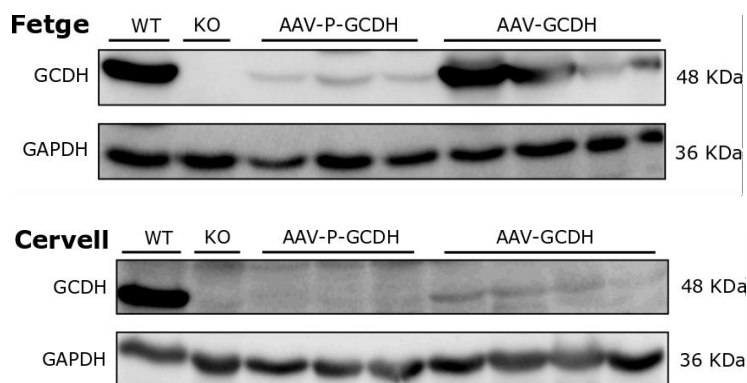


Figura 21. Anàlisi de l'expressió de GCDH després de la administració intravenosa dels vectors virals AAV-GCDH i AAV-P-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH en extractes proteics de fetge i cervell de ratolins control (WT), *Gcdh*^{-/-} (KO) i KO tractats a les 2 setmanes post-administració i.v. amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus indicat (n = 4-6).

Els ratolins *Gcdh*^{-/-} presenten uns nivells del metabòlit C5DC elevat en teixits i fluids corporals, d'acord amb l'absència de GCDH, de manera que els nivells de C5DC es poden considerar un biomarcador de la malaltia¹⁰¹. A continuació es va estudiar si el tractament amb AAV-P-GCDH o AAV-GCDH, tenia un efecte sobre l'acumulació de C5DC en fetge, cervell i en sèrum. Es va analitzar el contingut del metabòlit en animals control (WT), ratolins *Gcdh*^{-/-} tractats amb un o altre vector i ratolins *Gcdh*^{-/-} no tractats a les dues setmanes després del tractament.

Tant el tractament amb el vector AAV-P-GCDH com amb el vector AAV-GCDH, va donar lloc a una reducció dels nivells de C5DC en el fetge dels animals *Gcdh*^{-/-}. En sèrum s'observà un patró similar al del fetge, si bé la reducció en C5DC era superior en els animals tractats amb AAV-GCDH. A cervell, únicament el tractament amb el vector AAV-GCDH va permetre la reducció en el contingut de C5DC assolint valors similars al dels animals control (Figura 22).

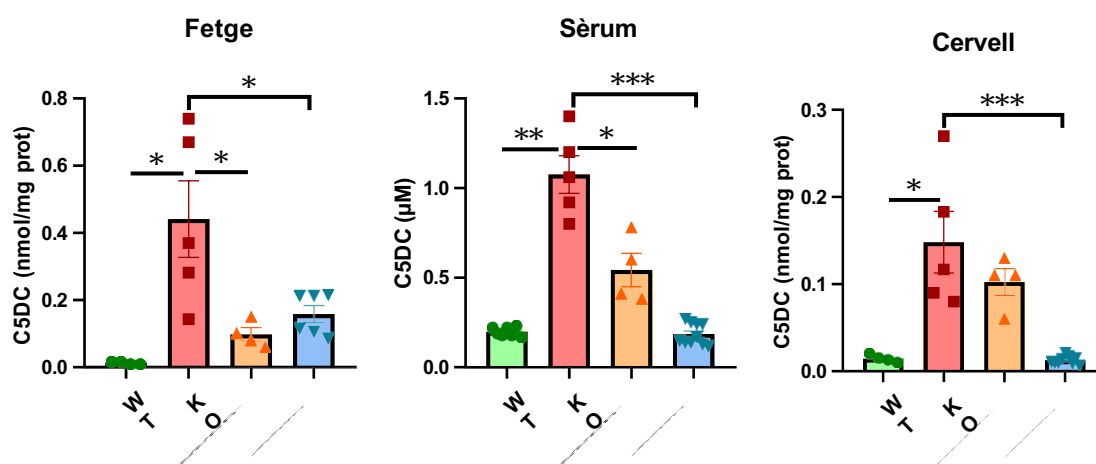


Figura 22: Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC després de la administració intravenosa dels vectors virals AAV-GCDH i AAV-P-GCDH

Nivells de C5DC en extractes de fetge i cervell i en el sèrum d'animals WT, KO i KO tractats amb AAV-P-GCDH o AAV-GCDH (n = 4-6) a les dues setmanes post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes ± SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

En base a aquest conjunt de resultats, el virus AAV-GCDH presentava un major potencial terapèutic i es va escollir per als estudis posteriors.

4.2 Estudi dels efectes d'una administració sistèmica (intravenosa) o locoregional (cisterna magna) sobre la capacitat de transducció del vector AAV-GCDH.

4.2.1 Anàlisi de la transducció després d'una administració intravenosa en diferents etapes del desenvolupament.

En l'acidúria glutàrica tipus I, la simptomatologia més greu de la malaltia és el resultat d'alteracions a nivell neurològic amb afectació en àrees del cervell com l'escorça o el nucli estriat principalment. En pacients adults també s'ha descrit una patologia renal ^{25,160}. És important doncs que el vector terapèutic pugui arribar bé a les àrees més susceptibles de dany. Tanmateix i tal i com s'ha descrit recentment, el restabliment de la funció metabòlica en fetge també pot contribuir a reduir la simptomatologia de la malaltia ¹¹⁶.

En aquest sentit, i per tal d'estudiar el potencial terapèutic del vector AAV-GCDH, es va explorar en primer lloc la seva capacitat per vehicular l'expressió de GCDH als teixits diana després d'una administració sistèmica per via intravenosa en diferents etapes del desenvolupament del ratolí: En el període neonatal P1, en una etapa intermitja P15 i en un període que podem considerar en ratolí com adult-jove P30. Es va analitzar l'expressió de GCDH en cervell (escorça, i nucli estriat), fetge i ronyó un mes després de l'administració (Figura 23).

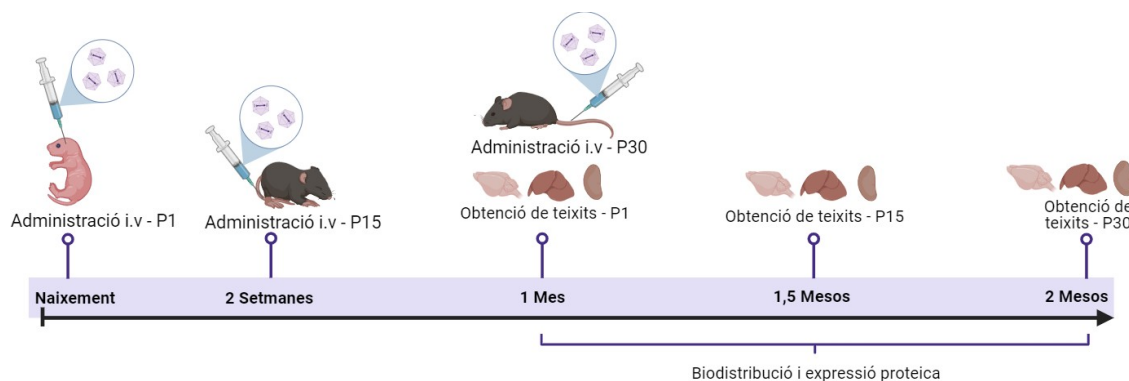


Figura 23. Esquema representatiu del procediment experimental d'administració del vector AAV-GCDH via intravenosa segons l'edat dels ratolins *Gcdh*^{-/-}.

Administració intravenosa en les etapes postnatales P1, P15 i P30. Dosi del vector 1×10^{11} gv/ratolí.

Obtenció de teixits 1 mes post-administració.

Es va injectar una dosi única de $1 \cdot 10^{11}$ vg/ratolí a ratolins mascle. La majoria dels estudis en aquest treball s'han dut a terme en ratolins mascle. En alguns casos també s'han inclòs femelles per comprovar que els efectes es mantenen en ambdós sexes. En cap cas es va observar cap alteració en el pes dels animals ni dany macroscòpic en els òrgans aïllats en el moment del sacrifici.

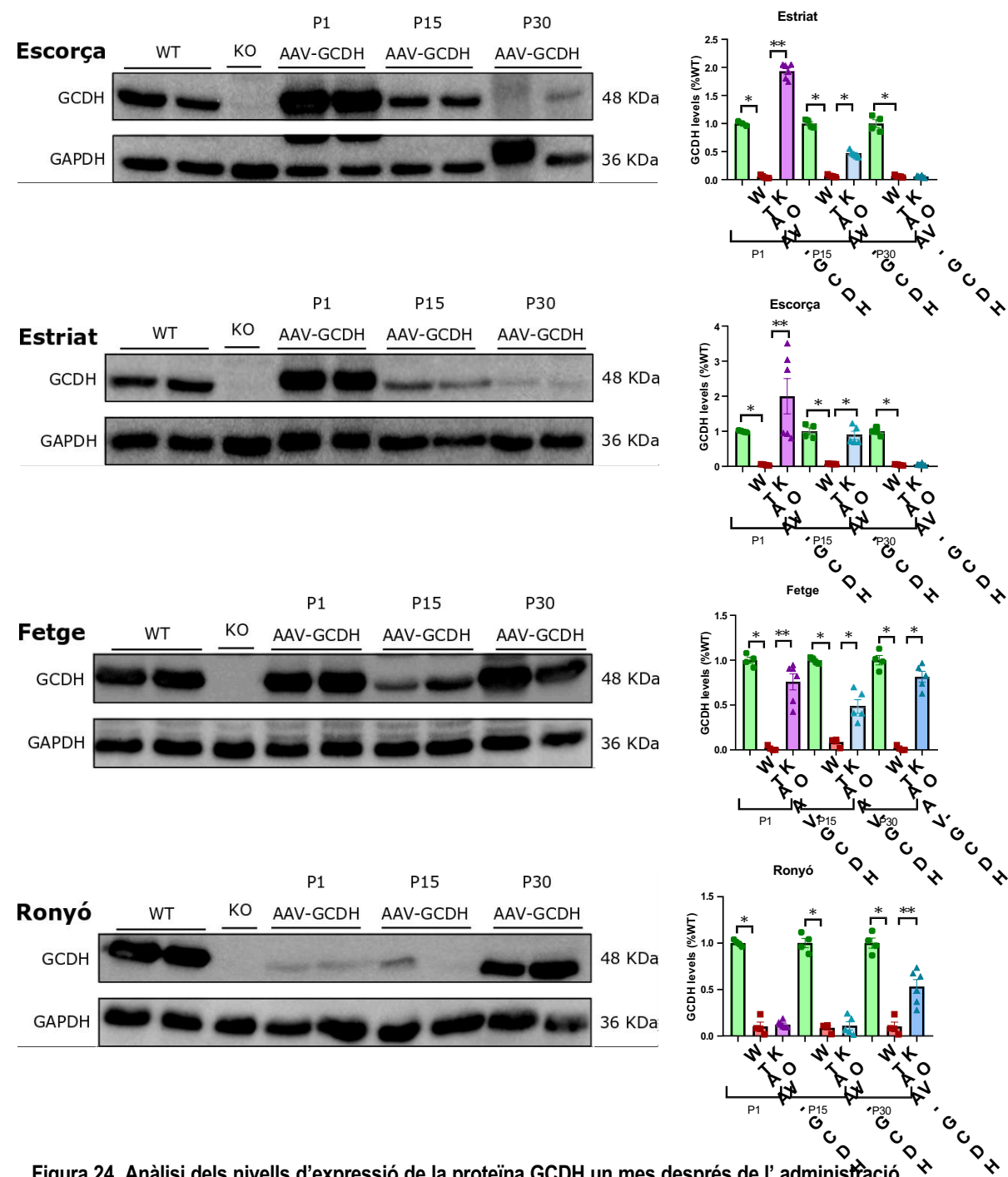


Figura 24. Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna GCDH un mes després de l'administració intravenosa a P1, P15 o P30 del vector AAV-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH a partir d'extractes proteics d'escorça, estriat, fetge i ronyó de ratolins control (WT), *Gcdh* ^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH un mes post-administració (n = 4-6).

L'anàlisi per Western Blot, va mostrar que els ratolins *Gcdh* ^{-/-} (KO), no presentaven expressió de GCDH, mentre que sí es podia detectar la proteïna en ratolins WT donat que l'anticòs utilitzat reconeixia tant la forma humana com la murina. L'expressió del transgen GCDH humà es va detectar als quatre teixits estudiats, escorça, nucli estriat, fetge i ronyó i en els animals tractats en cadascuna de les tres etapes (Figura 24). En els teixits cerebrals, escorça i estriat, s'observava que com més primerenca era l'administració del vector, major era l'expressió de la proteïna GCDH, això estaria d'acord amb que la dosi en vg/kg seria superior en els nounats ($5 \cdot 10^{13}$ vg/kg P1, 10^{13} vg/kg a P15 i $5 \cdot 10^{12}$ vg/Kg a P30). L'alta transducció observada en edats primerenques, estaria probablement també relacionada amb el fet que en aquestes etapes la barrera hematoencefàlica no està del tot formada i el vector és capaç d'arribar fàcilment a ambdues estructures ^{155,161}.

L'efecte de dosi no es va observar en tots els teixits. L'anàlisi d'expressió a fetge, va mostrar nivells alts de GCDH en totes les condicions assolint-se a P1 i P30 valors similars i superiors a P15. A ronyó, en canvi, només es va observar una bona expressió de GCDH, després d'una administració a P30.

Tenint en compte que el teixit cerebral era l'òrgan principal on ens interessava vehicular el vector AAV-GCDH, es va procedir a analitzar, en aquestes estructures, el grau de transducció a partir de la quantificació de genomes virals. Es va determinar el contingut de genomes virals, en mostres de ADN obtingudes d'escorça i nucli estriat, un mes després de l'administració del vector AAV-GCDH. En totes tres edats el nombre de genomes detectats a escorça va ser lleugerament superior al detectat a nucli estriat. I tant en escorça com en nucli estriat, es va detectar un nombre de genomes virals similar després de les administracions intravenoses de P1 i P15 i significativament superior a l'administració a P30 (Figura 25). Aquests resultats mostraven, tal i com s'observava amb les dades d'expressió de GCDH un efecte dosi-depenent probablement combinat amb la facilitat d'accés del vector als teixits en les etapes que la barrera hematoencefàlica encara no està del tot formada.

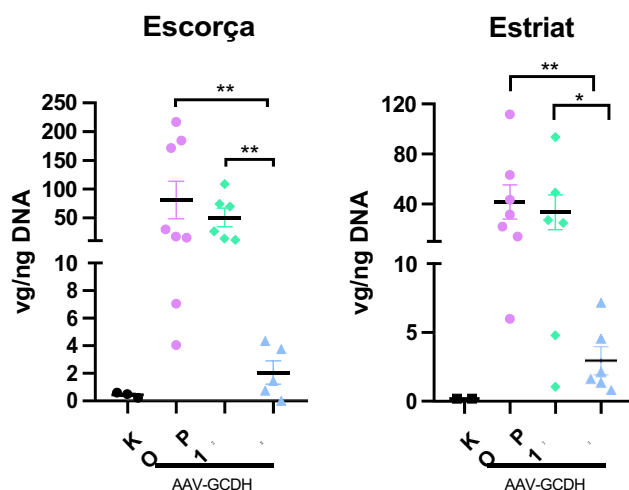


Figura 25. Anàlisi de biodistribució del genomes virals un mes després de l'administració intravenosa del vector AAV-GCDH a ratolins *Gcdh* $-/-$ a diferents edats.

Contingut de genomes virals en extractes d'escorça i d'estriat d'animals KO tractats amb AAV-GCDH segons el procediment descrit a Figures 5 ($n = 6-10$). Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Aquests resultats suggerien que l'administració del vector en etapes primerenques, especialment a P1, seria capaç d'assolir nivells elevats d'expressió de GCDH en teixits cerebrals, mentre que l'administració en etapes més tardanes, adult-joves P30 podria ser més indicada per transduir teixits perifèrics, essent molt destacable en el cas de la transducció a ronyó.

4.2.2 Anàlisi de la transducció després d'una administració a cisterna magna en diferents etapes del desenvolupament. Estudi comparatiu amb l'administració intravenosa.

A continuació es va estudiar si la injecció del vector a través d'una via locoregional que permetés accedir al líquid cefalorraquidi podria ser una alternativa a l'administració intravenosa. Es va procedir a analitzar, el potencial de transducció del vector AAV-GCDH, després d'una administració d'una dosi única de $1 \cdot 10^{11}$ vg/ratolí a cisterna magna en les etapes de P15 i P30 (Figura 26).

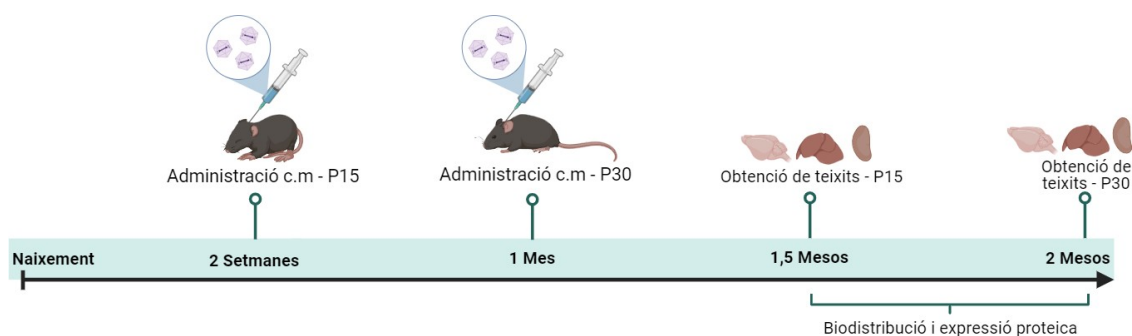


Figura 26. Esquema representatiu del procediment experimental d'administració del vector AAV-GCDH via cisterna magna segons l'edat dels ratolins *Gcdh*^{-/-}.

Administració a cisterna magna en les etapes postnatales P15 i P30. Dosi del vector 1×10^{11} gv/ratolí. Obtenció de teixits 1 mes post-administració.

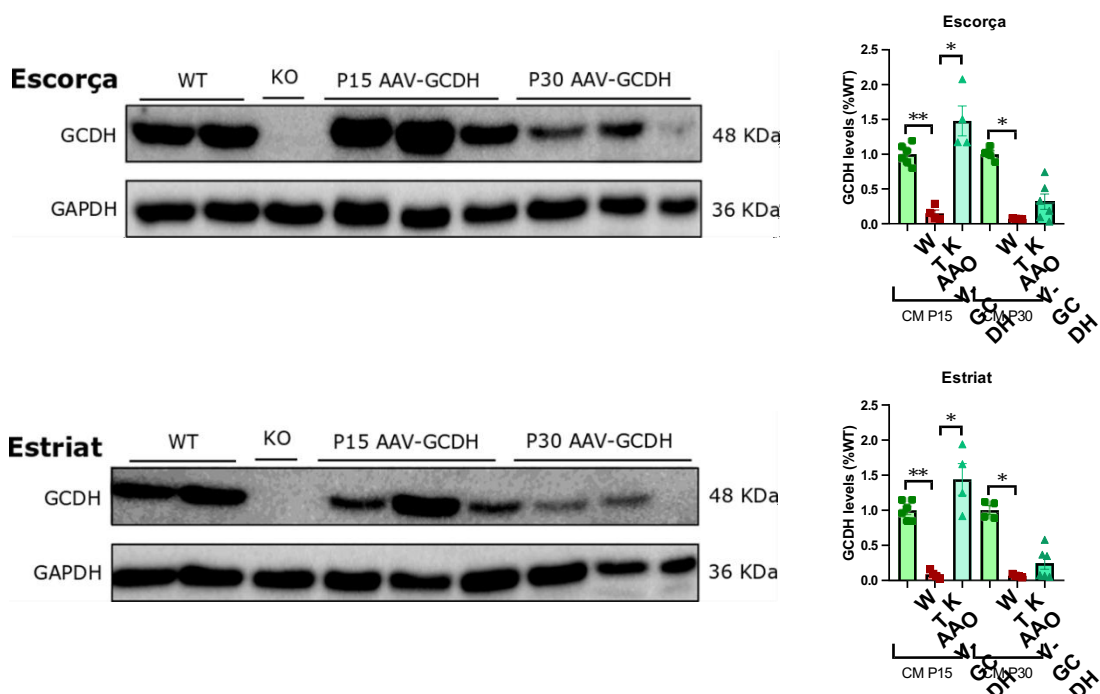


Figura 27. Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna GCDH un mes després de l'administració a cisterna magna a P15 o P30 del vector AAV-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH a partir d'extractes proteics d'escorça i d'estriat de ratolins control (WT), *Gcdh*^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH un mes post-administració (n = 4-6).

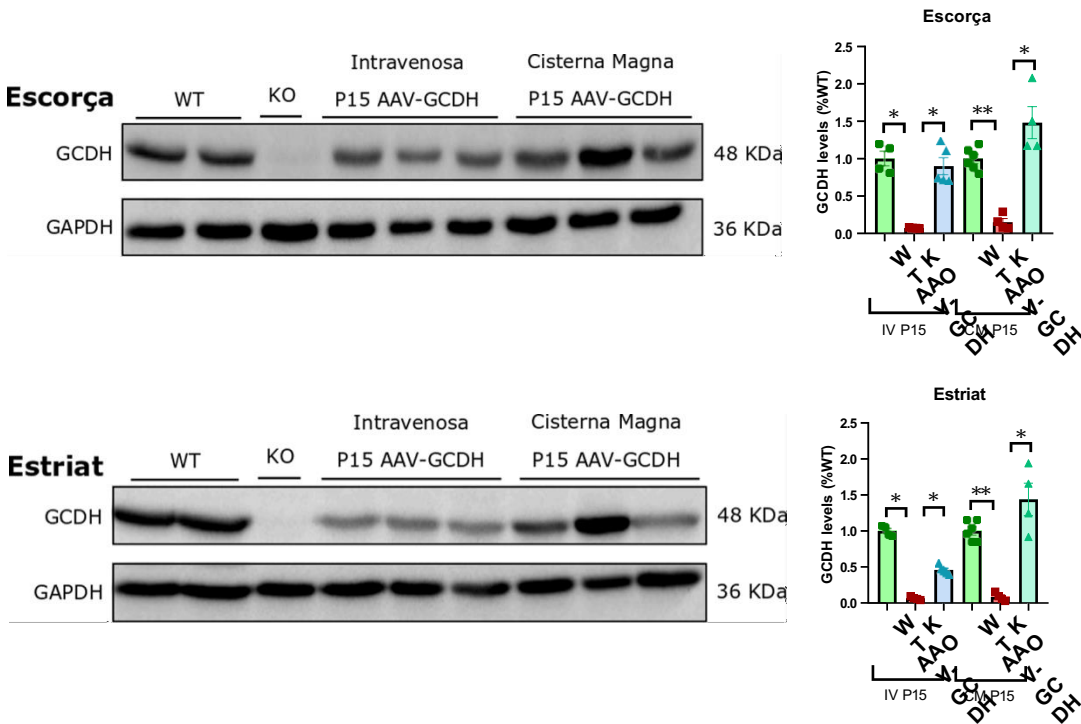
L'anàlisi per western blot de l'expressió de GCDH un mes després de l'administració del vector va demostrar que s'assolien nivells de GCDH més alts tant a escorça com al nucli estriat quan l'administració tenia lloc en l'etapa de P15, d'acord amb un efecte dosi-depenent (Figura 27).

En comparar l'expressió de GCDH a escorça i nucli estriat entre els animals que havien estat injectats via cisterna magna o via intravenosa a P15 es varen observar valors d'expressió lleugerament superiors després de la administració a cisterna magna (Figura 28A). Aquests resultats lligarien amb una menor dilució del vector quan s'utilitza aquesta via, el que permetria una millor transducció.

Posteriorment es va decidir comparar els nivells d'expressió de GCDH que s'assolien en escorça i nucli estriat un mes després de la injecció del vector en les condicions òptimes per cadascuna de les vies estudiades: P15 cisterna magna i P1 intravenosa. L'anàlisi per western blot va mostrar que l'expressió de GCDH era superior després d'una administració intravenosa a P1 (Figura 28B).

Aquests resultats indicaven que la via intravenosa en etapes primerenques assolía nivells d'expressió de GCDH a escorça i estriat molt similars o fins i tot superiors a les del control.

A)



B)

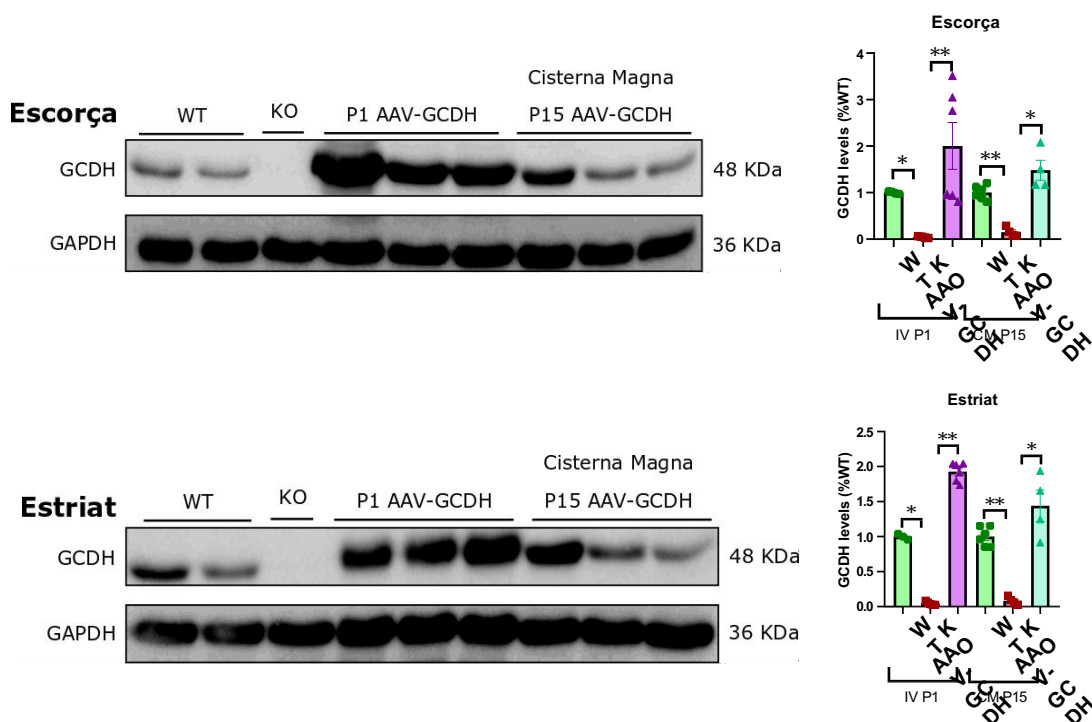


Figura 28. Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna GCDH un mes després de l'administració intravenosa o cisterna magna del vector AAV-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH a partir d'extractes proteics d' escorça i d'estriat de ratolins control (WT), *Gcdh* ^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH un mes post-administració (n = 4-6). A) Comparativa entre l'administració intravenosa i cisterna magna a la mateixa edat de desenvolupament (P15). B) Comparativa entre l'administració més òptima intravenosa (P1) i la de cisterna magna (P15).

L'anàlisi conjunt de l'administració del vector a diferents edats i per les dues vies estudiades, ens permetia identificar un efecte de dosi, especialment als teixits cerebrals, però també s'observava que aspectes com el tropisme del virus i la formació o no de la barrera hematoencefàlica estarien contribuint a la transducció.

Donats els bons resultats de transducció obtinguts a teixits cerebrals quan s'injectava per la via intravenosa a P1 i a òrgans perifèrics a P30, vam decidir continuar l'estudi amb aquestes dues edats i aplicant la via intravenosa. La injecció a cisterna magna es va descartar, al ser una estratègia més invasiva i al no aportar uns nivells de transducció molt significativament superiors a la via intravenosa. Per altra banda, la via intravenosa oferia la possibilitat d'arribar als òrgans perifèrics, on restablir l'expressió de GCDH també podria contribuir a la millora de la malaltia.

4.3 Anàlisi dels efectes d'una administració intravenosa sobre l'estabilitat de la transducció a llarg termini.

Tenint en compte que un dels objectius de la teràpia és el manteniment del seu efecte a llarg termini, vam procedir a estudiar l'estabilitat de la transducció després d'una administració intravenosa del vector AAV-GCDH a P1 i a P30. Es van comparar els valors d'expressió, l'activitat GCDH i el manteniment dels genomes virals 1 mes i 6 mesos després del tractament (Figura 29).

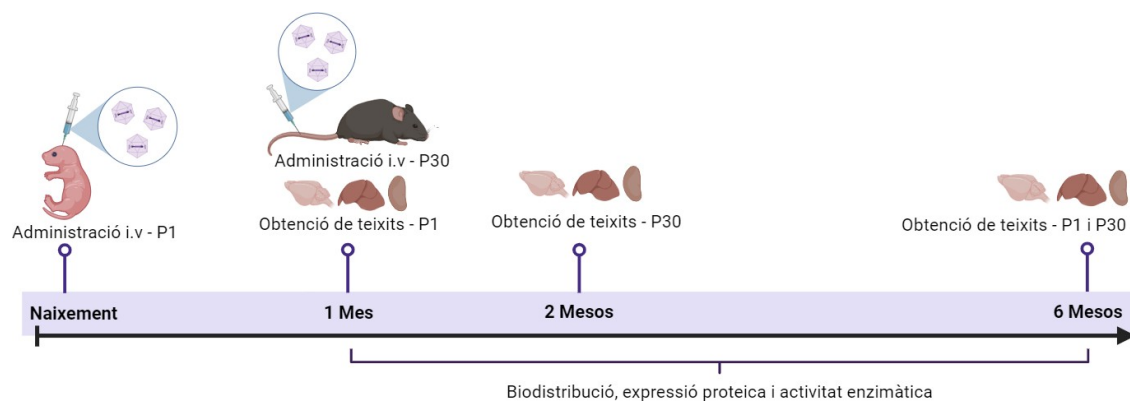


Figura 29. Esquema representatiu del procediment experimental de l'estudi comparatiu de les administracions intravenoses a P1 i P30 del vector AAV-GCDH.

Administració intravenosa: a P1 o P30, dosi 1×10^{11} gv/ratolí. Sacrifici i obtenció de teixits 1 mes post-administració o als 6 mesos d'edat en les 2 edats d'administració.

En determinar els nivells de GCDH després d'una administració intravenosa a P30, es va observar una expressió de GCDH molt baixa als teixits cerebrals en els dos temps estudiats a 1 mes i 5 mesos post-tractament. En fetge i ronyó, tal i com ja havíem vist anteriorment s'obtenien bons nivells d'expressió de GCDH un mes després del tractament i també s'observava una caiguda als 5 mesos assolint nivells al voltant del 50% dels del ratolins control (Figura 30).

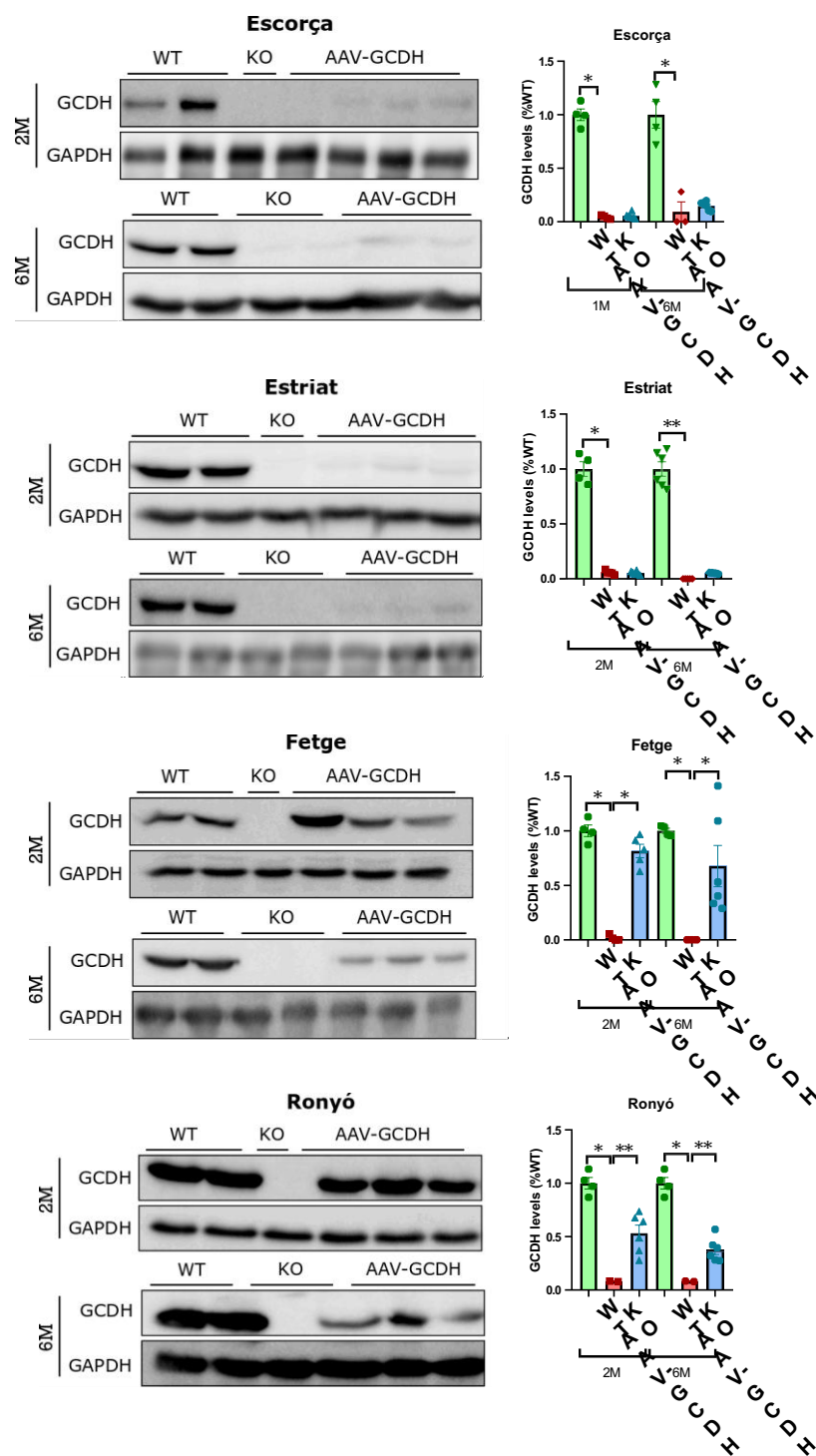
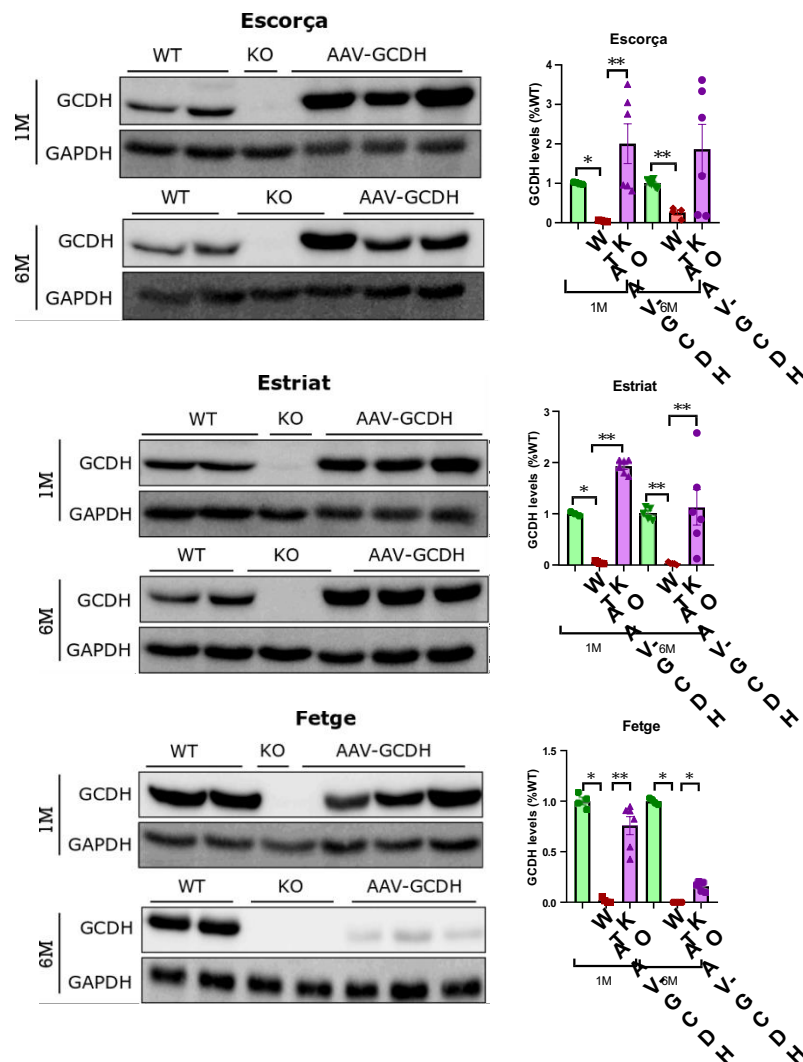


Figura 30. Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna GCDH un mes i cinc mesos després de l'administració intravenosa a P30 del vector d'AAV-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH a partir d'extractes proteics d' esccorça, estriat, fetge i ronyó de ratolins control (WT), *Gcdh*^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH un mes i cinc mesos post-administració (n = 4-6).

L'anàlisi per western blot de l'expressió de GCDH després de l'administració a P1, va revelar que en els teixits cerebrals hi ha una bona expressió de GCDH un mes post-tractament, tal i com ja havíem observat en experiments anteriors assolint nivells similars als dels ratolins control que es mantenen sis mesos post-administració del vector (Figura 31). Tanmateix, tot i assolir una bona transducció a fetge al mes post-tractament, als 6 mesos els valors de GCDH eren molt inferiors, al voltant d'un 15% en relació als animals control, probablement degut a l'efecte de dilució per creixement de l'òrgan. Cal tenir present que en aquest cas des de el moment de la injecció a P1 fins a l'edat de 6 mesos el fetge hauria crescut notablement. En el cas del ronyó, els nivells de transducció van ser baixos en els dos temps.



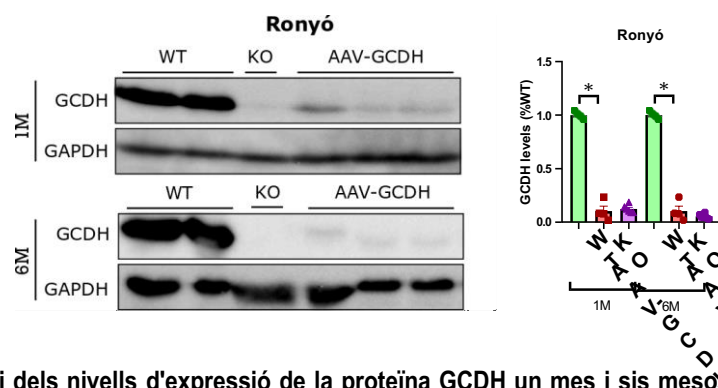


Figura 31. Anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna GCDH un mes i sis mesos després de l'administració intravenosa a P1 del vector AAV-GCDH.

Immunodetecció per Western blot de GCDH a partir d'extractes proteics d'escorça, estriat, fetge i ronyó de ratolins control (WT), *Gcdh*^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH un mes i sis mesos post-administració (n = 4-6).

La proteïna GCDH expressada des del vector AAV-GCDH donava lloc a una proteïna funcional, amb activitat enzimàtica, detectable per un assaig d'activitat en gel i que en fetge i estriat de ratolins injectats a P1 es mantenia fins als 6 mesos post-tractament. En canvi, després d'una administració a P30 només era possible detectar activitat GCDH a fetge, en els dos temps estudiats (Figura 32). En ronyó no es va dur a terme l'assaig, però es podria especular que en els animals injectats a P30 l'activitat GCDH podria ser detectable.

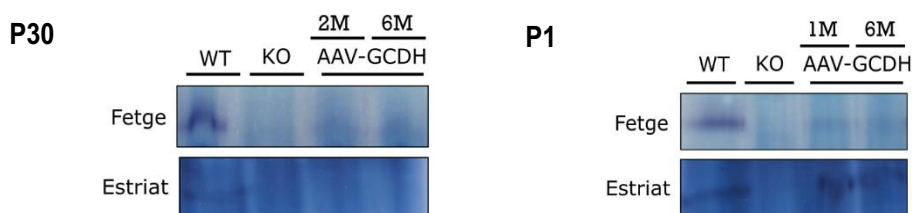


Figura 32: Anàlisi de l'activitat enzimàtica de GCDH en extractes de fetge i estriat després de l'administració intravenosa a P1 i P30 del vector AAV-GCDH.

Assaig d'activitat GCDH en gel en extractes de teixit de ratolins control (WT), *Gcdh*^{-/-} (KO) i KO tractats amb 1×10^{11} gv/ratolí del virus AAV-GCDH després d'un mes o 5 mesos de l'administració intravenosa a P30 o d'un mes i sis mesos després de l'administració a P1.

L'estudi d'estabilitat del vector AAV-GCDH també es va analitzar a través de la quantificació dels genomes virals. Ens vam centrar a analitzar el contingut de genomes virals en els teixits cerebrals d'escorça i estriat. Després d'una administració a P1, es va observar que el nombre de genomes virals era significativament menor als 6 mesos post-tractament respecte els detectats 1 mes després de la teràpia en ambdues estructures. Aquest efecte de dilució del vector, probablement associat a un creixement de l'òrgan no es traduïa en una menor expressió, suggerint que les cèl·lules neuronals modificades serien capaces de mantenir una expressió sostinguda. En el cas dels ratolins injectats amb el vector a P30, el nombre de genomes detectats als dos temps va ser molt baix, el que correlacionava amb la poca expressió de GCDH (Figura 33).

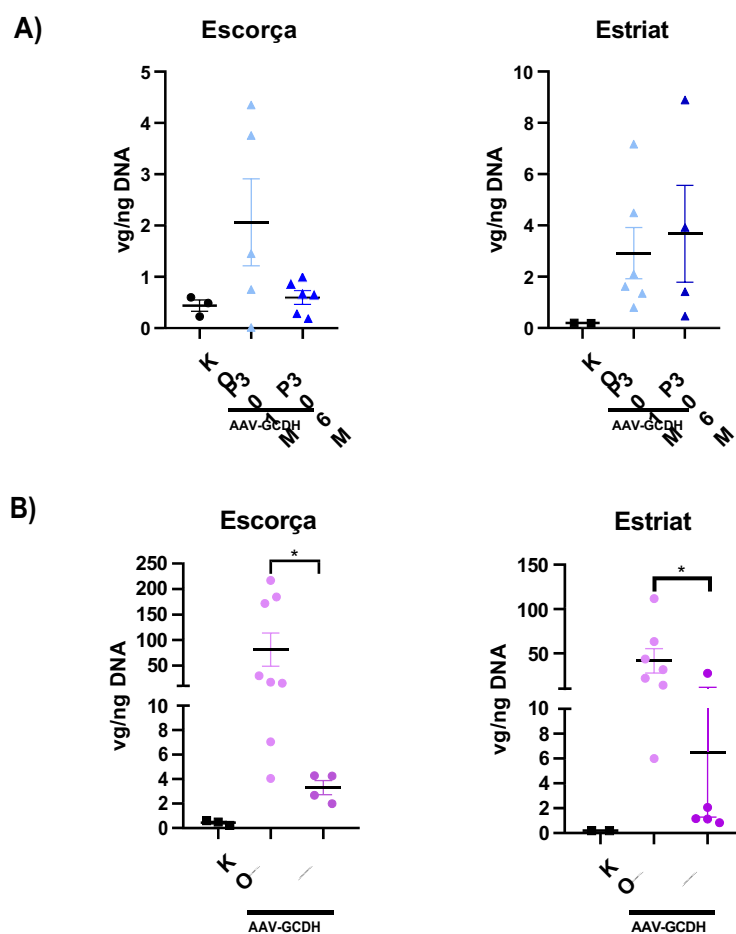


Figura 33. Anàlisi de biodistribució del genomes virals un mes i cinc o sis mesos després de l'administració intravenosa del vector AAV-GCDH a ratolins *Gcdh* ^{-/-} a diferents edats.

Contingut de genomes virals en extractes d'escorça, estriat, fetge i ronyó d'animals KO tractats amb AAV-GCDH segons el procediment descrit a Figura 29 (n = 6-10). Les dades s'expressen com a mitjanes ± SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. A) Administració intravenosa a P30. B) Administració intravenosa a P1.

4.4 Estudi dels efectes d'una administració intravenosa del vector AAV-GCDH a ratolins *Gcdh* ^{-/-} nounats (P1) o adults joves (P30) sotmesos a una dieta estàndard o una dieta alta en lisina sobre aspectes de la fisiopatologia metabòlica a diferents temps post-administració.

4.4.1. Efectes sobre el contingut de metabòlits

En l'acidúria glutàrica tipus I hi ha un cúmul de metabòlits (àcid glutàric (GA), àcid 3-hidroixiglutàric (3-OHGA) i glutarilcarnitina (C5DC)) degut a la deficiència enzimàtica de la glutaril-CoA deshidrogenasa ²⁵. El cúmul dels metabòlits GA i 3-OHGA en cervell és neuro tòxica, i de fet l'acidúria glutàrica és considerada una acidúria cerebral orgànica.

El model de ratolí KO també presenta nivells augmentats d'aquests metabòlits en diferents teixits, tot i que el fenotip que presenten aquests animals és molt lleu. Tanmateix, diversos estudis han mostrat que en exposar els ratolins *Gcdh* ^{-/-}, a una dieta alta en proteïna o en lisina hi ha un increment en el contingut d'aquests metabòlits i apareix un fenotip sever que pot arribar a comprometre la supervivència dels ratolins afectant al voltant del 50% dels animals ^{95,96}.

Per tant, una teràpia eficaç per AG1 hauria de ser capaç de controlar els nivells de metabòlits en els òrgans afectats. En aquest sentit es va estudiar la capacitat del vector AAV-GCDH per modular el contingut de metabòlits en els ratolins *Gcdh* ^{-/-} quan aquests eren exposats a una dieta estàndard (SD, 0,9% de lisina) o a una dieta alta en lisina (HLD, 4,7% de lisina). L'administració del vector es va dur a terme en les etapes de P1 i P30. L'exposició a HLD va ser un període curt de 4 o 21 dies depenent de si l'administració de la teràpia era a P1 o a P30 respectivament i un període que podríem considerar crònic fins que els animals tenien 6 mesos d'edat (Figura 34).

El grup corresponent a l'estratègia de P1 va rebre només una exposició a HLD de 4 dies ja que a partir del dia 5 dia s'observava letalitat per la dieta. En l'estratègia de P30 això no era així, i es va mantenir la HLD fins a 21 dies. Aquesta diferència en l'impacte de la dieta sobre la vida dels animals, coincideix amb que els animals tractats a P1, just després del deslletament eren mantinguts amb la dieta HLD, mentre que els animals tractats a P30 abans de ser exposats a HLD estaven una setmana en una dieta estàndard.

	Tractat		Tractat (+AAV-GCDH)
	WT	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	
	WT + SD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} + SD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} + AAV-GCDH + SD
	WT + HLD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} + HLD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} + AAV-GCDH + HLD

Figura 34. Taula resum dels grups experimentals per a l'estudi bioquímic dels metabòlits GA, 3-OHGA i CD5C.

Els animals varen ser mantinguts amb una dieta estàndard (SD) amb un contingut de lisina (0,9%) o amb una dieta alta en lisina HLD que conté un (4.7%) de lisina. (n= 8 ratolins/grup).

En l'estratègia d'administració del vector a P30, una setmana després de la injecció del vector els animals es varen separar en els grups de dieta estàndard o dieta alta en lisina i es van mantenir així fins al sacrifici a l'edat de 2 mesos o 6 mesos i coincidint amb 1 mes o 5 mesos post-tractament. En aquests dos punts es van aïllar els diferents òrgans: fetge, ronyó, escorça, estriat i també es va obtenir sèrum. En tots els teixits i fluids obtinguts es va procedir a l'anàlisi bioquímica dels metabòlits àcid glutàric, àcid 3-OH glutàric, i glutarilcarnitina (Figura 35).

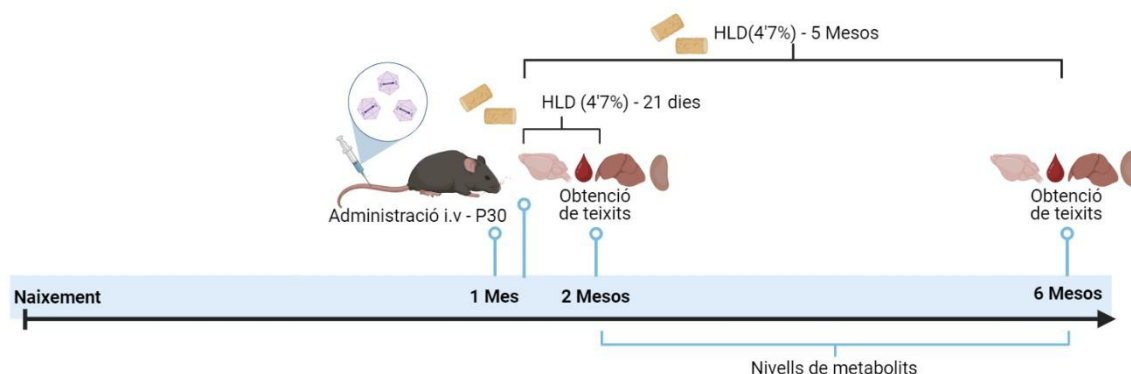


Figura 35. Esquema representatiu del procediment experimental en condicions d'exposició a dieta SD i HLD després d'una administració intravenosa a P30 en ratolins *Gcdh* ^{-/-}. Anàlisi bioquímica.

Administració intravenosa de 1×10^{11} gv/ratolí del vector AAV-GCDH. Obtenció de teixits i recollida de sèrum a un mes i cinc mesos post-administració.

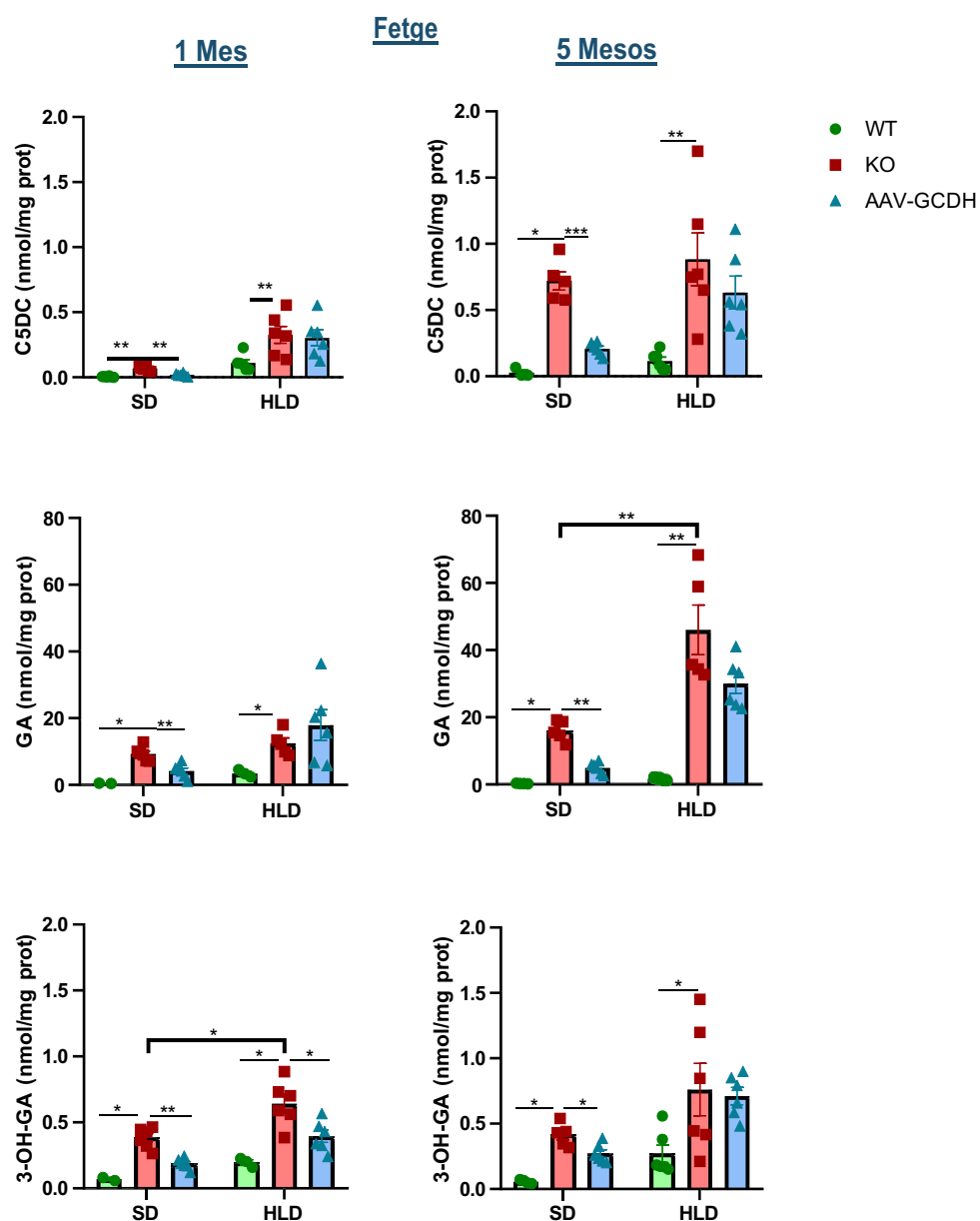
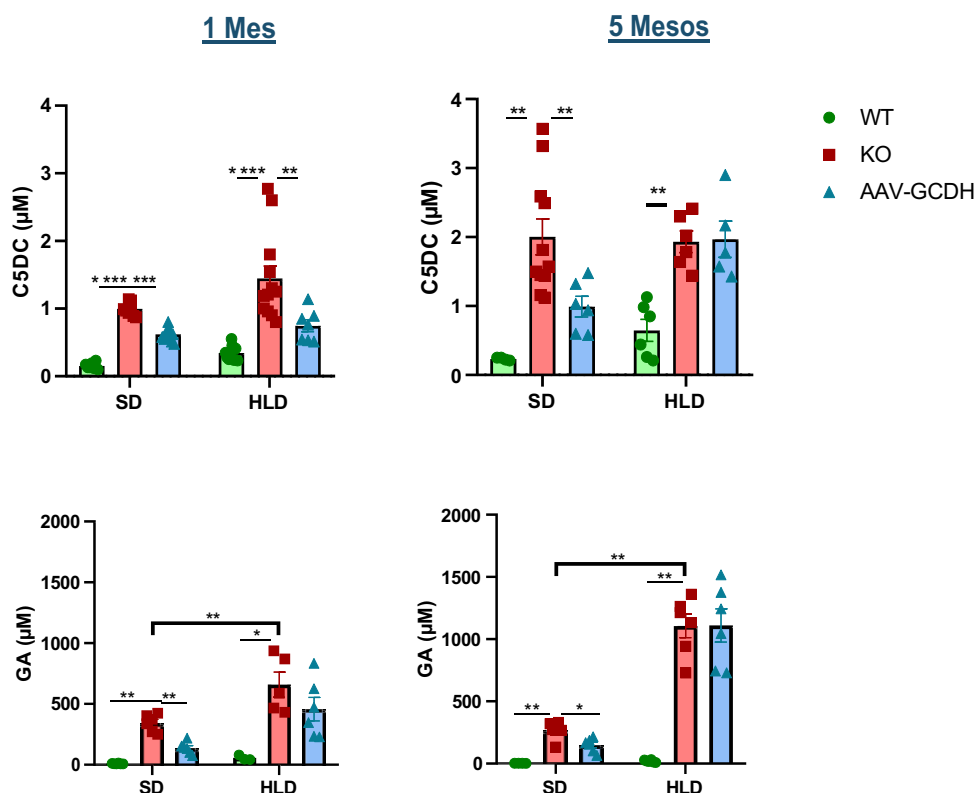


Figura 36. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P30 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes de fetge d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH ($n = 4-6$) al mes o cinc mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

L'anàlisi de metabòlits va demostrar en primer lloc, que efectivament els ratolins KO tenien valors de cadascun dels metabòlits lleugerament superiors als animals control i que aquests augmentaven en condicions de dieta alta en lisina, essent en la majoria dels casos més evident després de l'exposició crònica al llarg de 5 mesos (Figures 36-40). El tractament amb el vector AAV-*GCDH* va revelar una reducció estadísticament significativa del contingut de tots els metabòlits en fetge, en els animals alimentats amb una dieta estàndard un mes després del tractament que es mantenia almenys fins als 5 mesos (Figura 36). En canvi, en el grup d'animals tractats que havien estat sotmesos a la dieta alta en lisina només es va observar una reducció en el contingut de 3-OHGA un mes post-tractament. Resultats similars es varen observar al analitzar el sèrum d'aquests animals (Figura 37). Aquesta concordança estaria d'acord amb el fet que el contingut de metabòlits circulants a torrent sanguini és fonamentalment un reflex del que es troba en fetge.

Sèrum



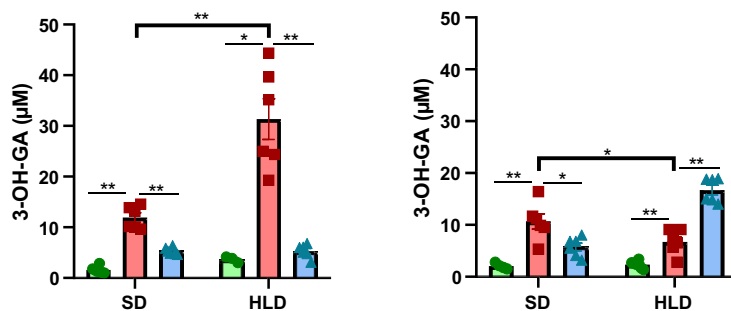


Figura 37. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P30 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en sèrum d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-6) al mes o cinc mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

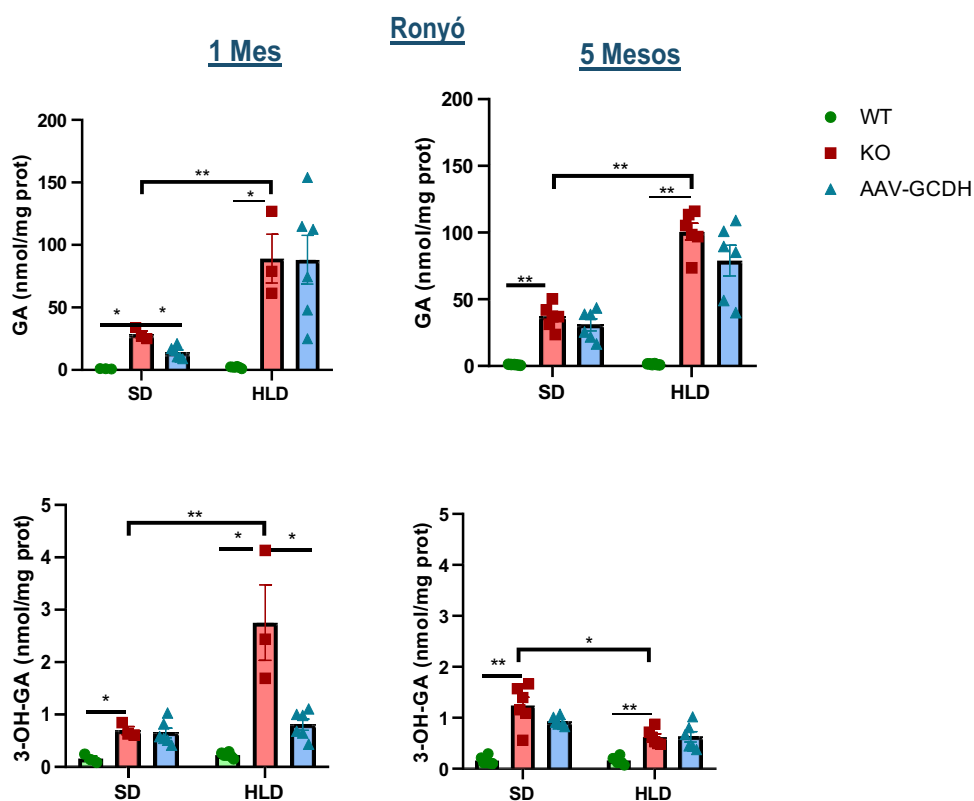


Figura 38. Anàlisi del contingut del metabòlit GA i 3-OHGA després de la administració intravenosa a P30 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes de ronyó d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-6) al mes o cinc mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

En ronyó, es va observar una reducció significativa, un mes post-tractament, en el cúmul de GA en animals exposats a una dieta estàndard, i de 3-OHGA en els animals amb dieta alta en (Figura 38).

L'anàlisi de metabòlits en els teixits cerebrals d'escorça i nucli estriat va mostrar molt poca eficàcia de la teràpia (Figures 39,40). Només s'observà una reducció en el contingut de 3-OHGA en escorça un mes després del tractament tan en ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a una dieta estàndard com en els que estaven sota una dieta alta en lisina (Figura 39).

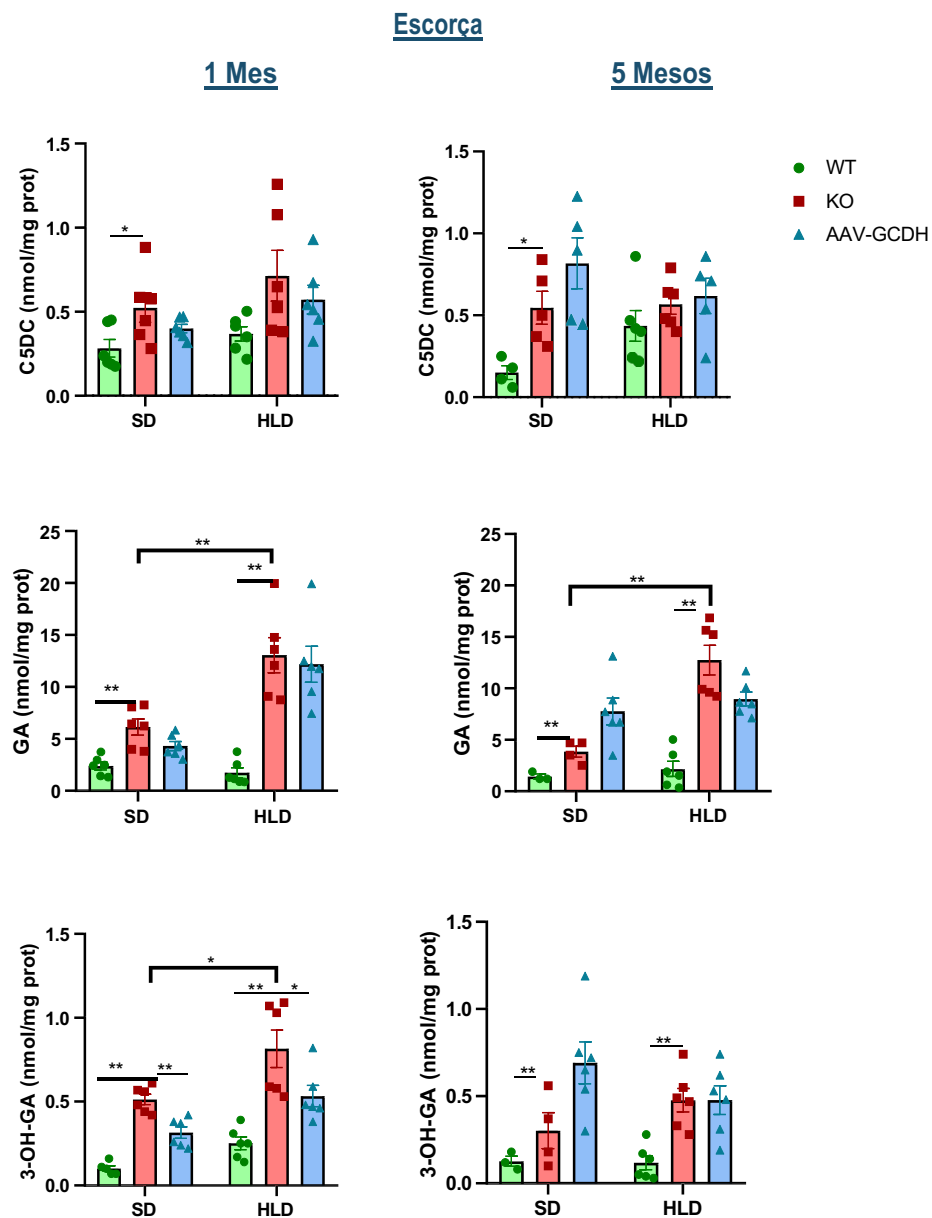


Figura 39. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P30 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes d'escorça d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-6) al mes o cinc mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

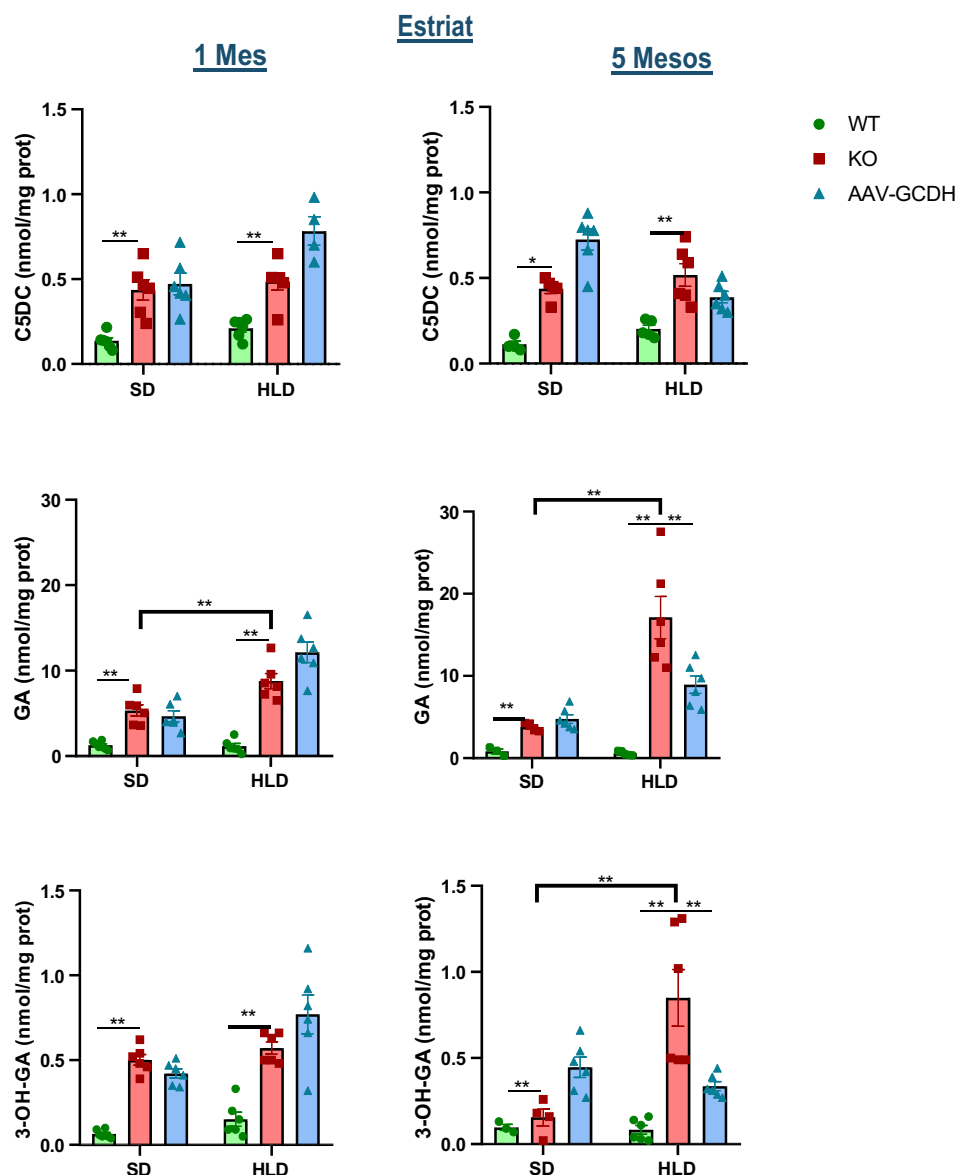


Figura 40. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P30 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes d'estriat d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-6) al mes o cinc mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

En conjunt aquests resultats mostraven que en fetge i sèrum, hi havia una reducció dels nivells de glutarilcarnitina, àcid glutàric i 3-OH àcid glutàric que es mantenia fins a 5 mesos post-administració del vector en condicions de dieta estàndard, coincidint amb una bona expressió de GCDH en fetge. Tanmateix, en ronyó tot i la bona expressió detectada, els efectes sobre els metabòlits eren molt lleus. En teixit cerebral, d'acord amb la baixa expressió de GCDH i l'absència d'activitat enzimàtica no s'observà cap efecte de la teràpia en estriat. Tanmateix, tot i la poca transducció a escorça la reducció de 3-OHGA feia pensar en un possible efecte mediat per l'expressió de GCDH a fetge.

En l'estratègia d'administració a P1, a les tres setmanes després de la injecció del vector, coincidint amb el moment del deslletament, els animals es varen separar en els grups de dieta estàndard o dieta alta en lisina i es van mantenir així fins al sacrifici a l'edat de 1 mes o 6 mesos i coincidint amb 1 mes o 6 mesos post-tractament.. En aquests dos punts es van aïllar els diferents òrgans: fetge, escorça, estriat i també es va obtenir sèrum. En tots els teixits i fluids obtinguts es va procedir a l'anàlisi bioquímica dels metabòlits àcid glutàric, àcid 3-OH glutàric, i glutarilcarnitina (Figura 41).

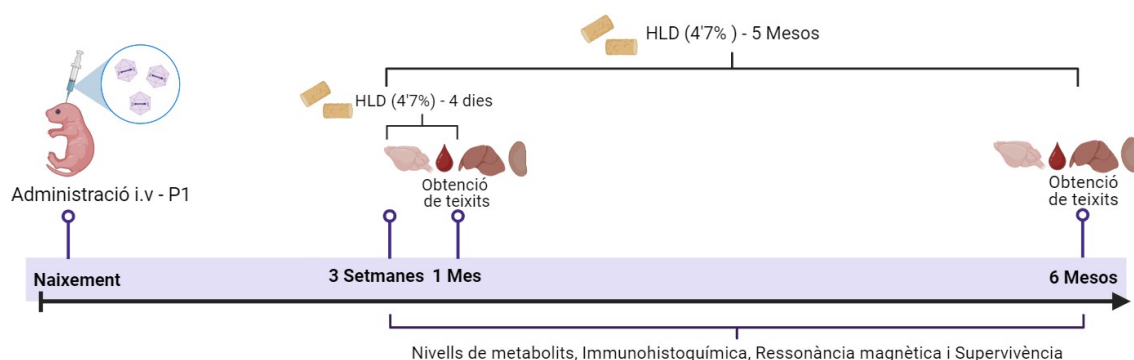


Figura 41. Esquema representatiu del procediment experimental en condicions d'exposició a dieta SD i HLD després d'una administració intravenosa a P1 en ratolins *Gcdh*^{-/-}.

Administració intravenosa de 1×10^{11} gv/ratolí del vector AAV-*GCDH*. Obtenció de teixits i recollida de sèrum a un mes post-administració o sis mesos post-administració.

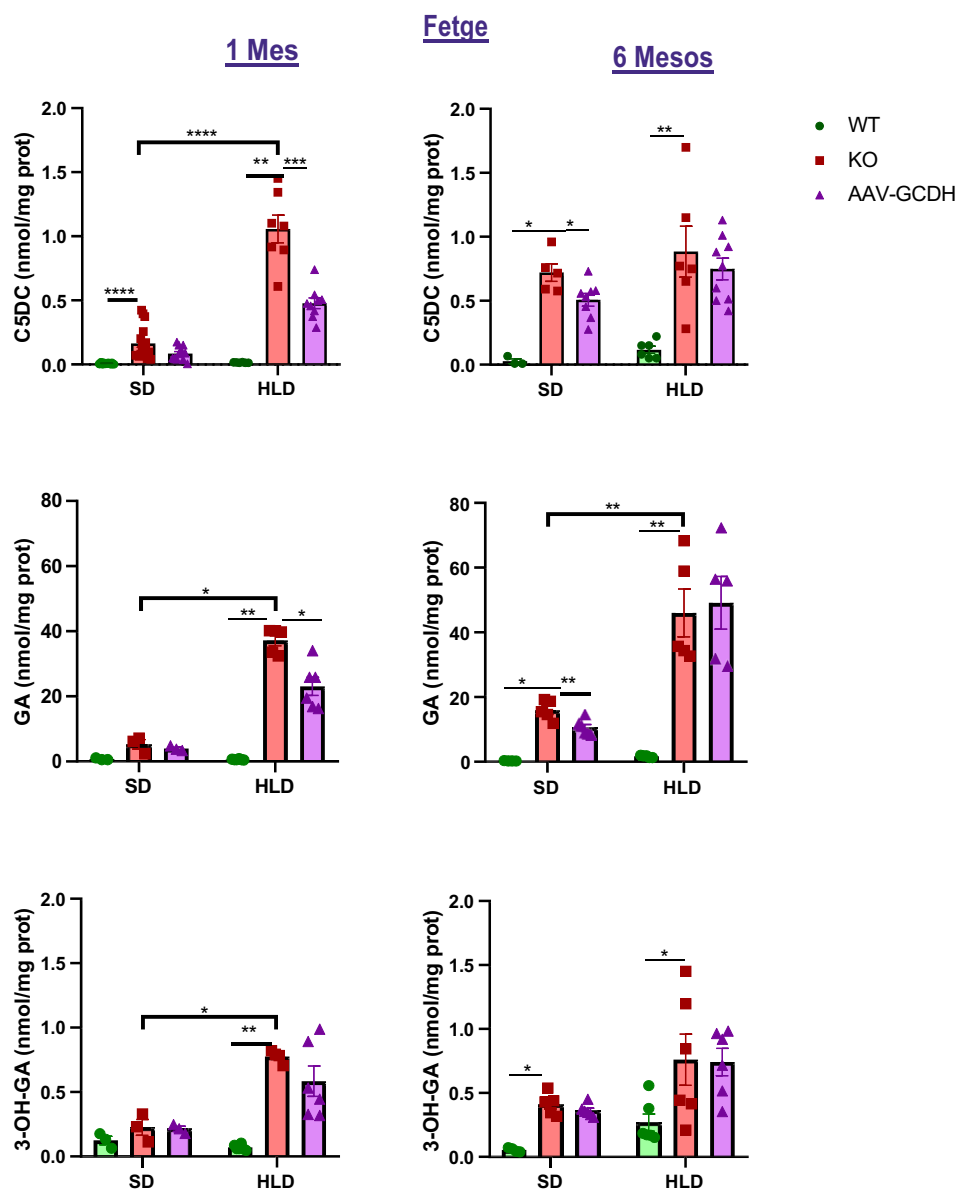
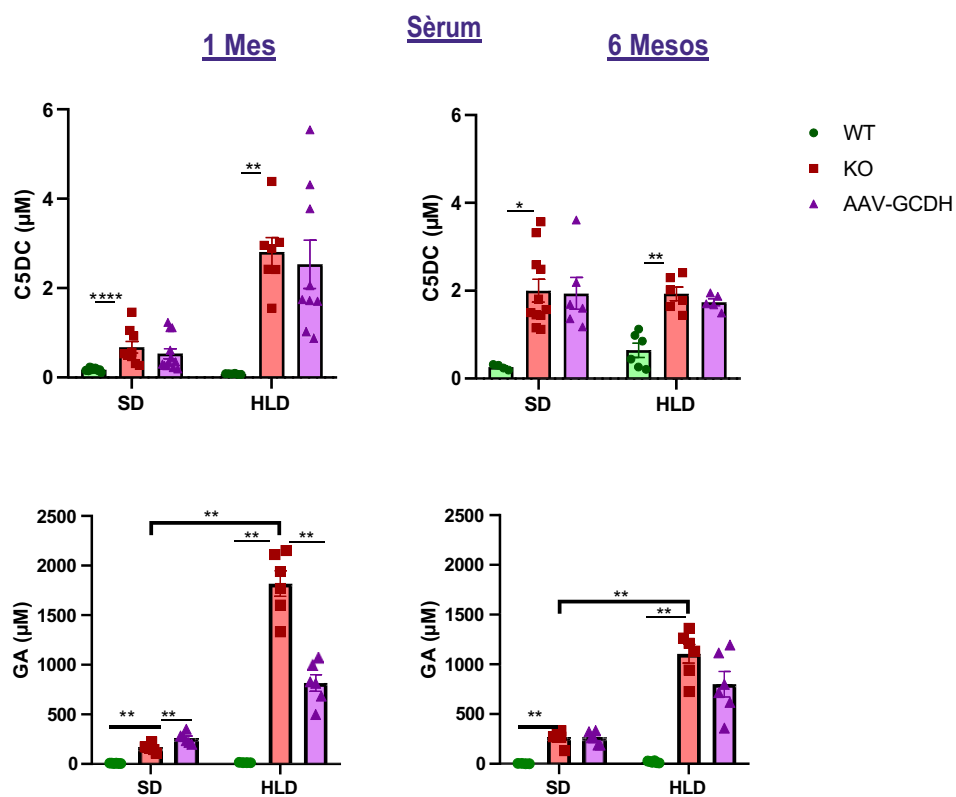


Figura 42. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P1 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes de fetge d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-10) al mes o sis mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

L'anàlisi de metabòlits va revelar, una vegada més, que els ratolins KO presentaven nivells superiors de tots els metabòlits en comparació amb els animals control i que aquests nivells augmentaven en condicions d'una dieta rica en lisina, sobretot després de 5 mesos d'exposició (Figures 42-45). El tractament amb el vector *AAV-GCDH* en període neonatal, va revelar una disminució en el contingut de GA i CD5C en el fetge en el grup d'animals sotmesos a una dieta alta en lisina, un mes després de la teràpia que no es mantenia fins als 6 mesos. Tanmateix als 6 mesos sí s'observà una disminució estadísticament significativa en el contingut d'aquests metabòlits en els ratolins alimentats amb una dieta estàndard (Figura 42). Aquests resultats suggereixen que l'expressió de GCDH a 1 mes post administració seria suficient per regular el contingut de metabòlits a fetge en situacions d'alta càrrega de lisina, però no es podria mantenir en el temps, mentre que una expressió sostinguda en fetge, tot i reduïda, quan els nivells de metabòlits no son molt elevats, com succeeix amb al dieta estàndard, podria ser suficient per controlar el contingut de metabòlits a llarg termini. En sèrum s'observà un patró similar tot i que els metabòlits més sensibles i on es detectaven reduccions significatives van ser el GA i el 3-OHGA (Figura 43).



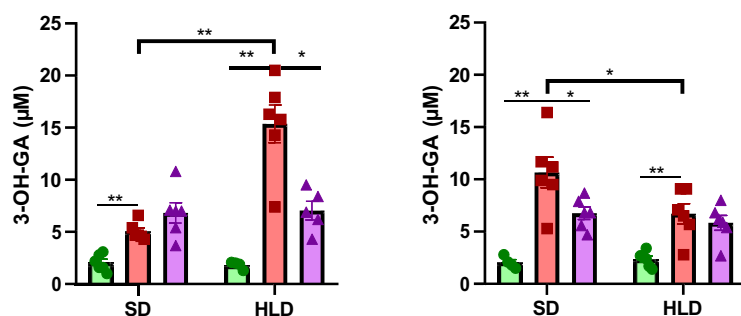
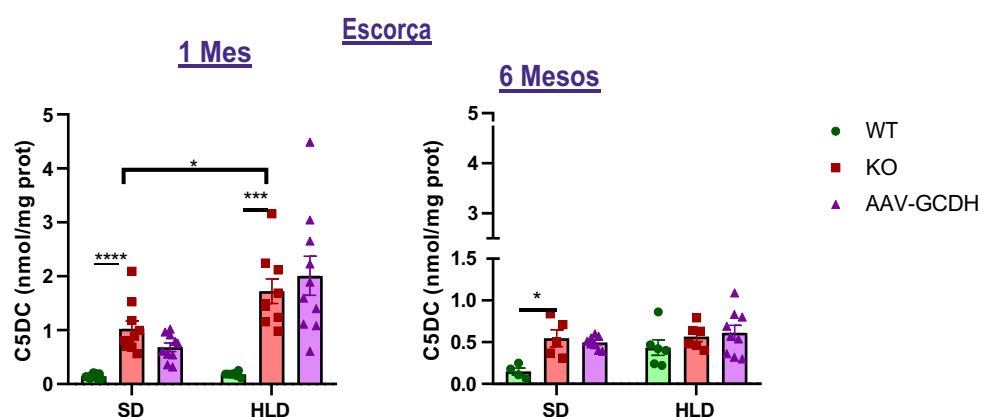


Figura 43. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P1 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en sèrum d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH ($n = 4-10$) al mes o sis mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

L'avaluació dels metabòlits als teixits cerebrals, va donar una resposta diferent depenent del teixit. En escorça, no es varen observar canvis significatius en cap dels metabòlits ni en cap dels dos períodes analitzats (Figura 44). En canvi, en el nucli estriat, es va detectar una disminució significativa en el contingut de tots els metabòlits un mes després del tractament, que es va mantenir fins a 6 mesos en els ratolins *Gcdh*^{-/-} sotmesos a una dieta rica en lisina (Figura 45).



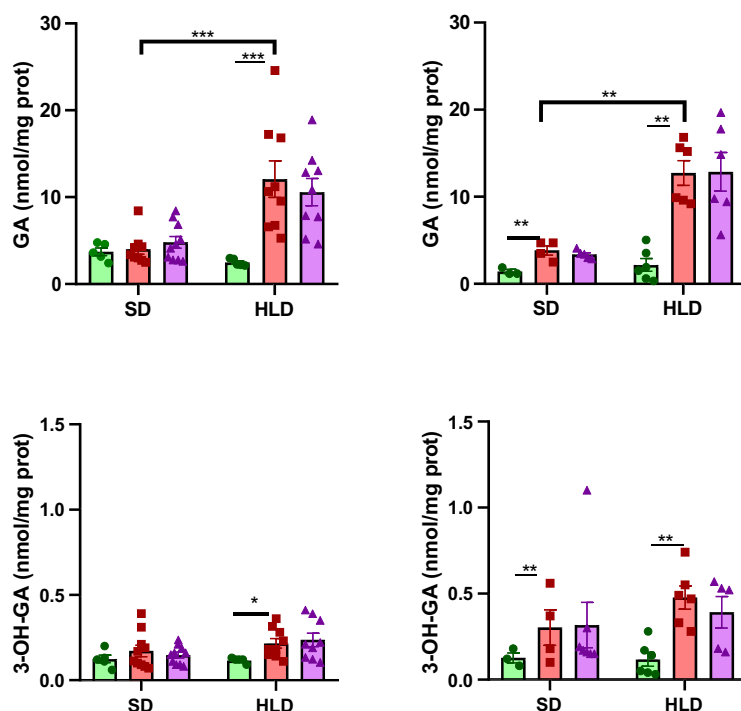
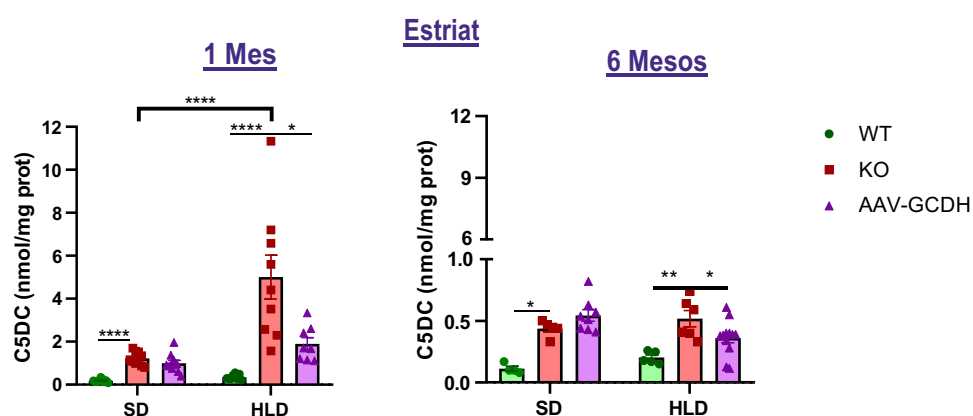


Figura 44. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P1 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes d'escorça d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-10) al mes o sis mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.



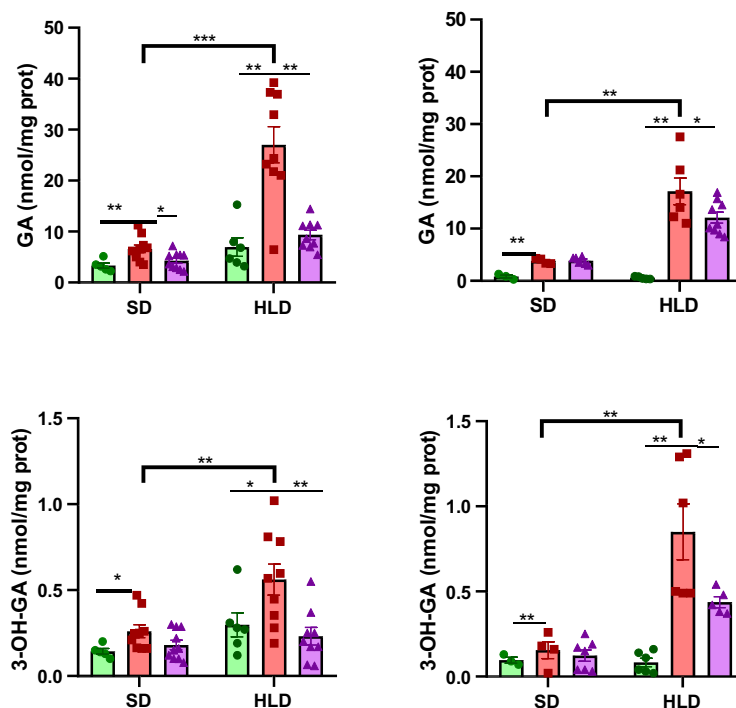


Figura 45. Anàlisi del contingut del metabòlit C5DC, GA, 3-OHGA després de la administració intravenosa a P1 del vector viral AAV-GCDH.

Nivells de C5DC, GA 3-OHGA en extractes d'estriat d'animals WT, KO i KO amb AAV-GCDH (n = 4-10) al mes o sis mesos post-administració del vector. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

En resum l'anàlisi metabòlic de l'estratègia d'administració a P1, mostrava un rescat parcial d'alguns metabòlits en fetge i sèrum un mes després del tractament sota dieta alta en lisina i 6 mesos després del tractament en condicions de dieta estàndard, que es podria explicar per les fluctuacions en l'expressió de GCDH. En escorça, no vam observar canvis significatius en el contingut de metabòlits tot i haver observat expressió de GCDH i detecció de genomes virals. En, canvi en estriat, i en les condicions més desfavorables, d'exposició a una dieta alta en lisina, s'observà reducció en el contingut de metabòlits fins a 6 mesos després de l'administració del vector terapèutic AAV-GCDH.

Aquesta discrepància entre les dades d'expressió de GCDH i la manca de correcció metabòlica en escorça en contraposició en la bona correlació observada en el nucli estriat requereix d'un estudi molt més detallat. Es podria especular que en ser l'escorça una estructura molt més gran, la transducció no és homogènia i quan analitzem unes dades i altres estariem recollint mostra d'àrees diferents, no equiparables en transducció. Per altra banda també cal tenir en compte la susceptibilitat de transducció amb AAV9 de les diferents poblacions cel·lulars en el sistema nerviós central, així com la densitat de cada població en les diferents regions, tots ells factors que podrien contribuir a l'heterogeneïtat observada.

4.4.2 Efectes sobre l'homeòstasi redox en teixits cerebrals.

L'estudi del model *Gcdh*^{-/-} ha posat en evidència que la sobrecàrrega de lisina en aquests animals provoca un trencament de l'equilibri redox en el cervell i s'han descrit alteracions en diferents paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu ^{106,110,111}. Ens vàrem centrar en analitzar si érem capaços de reproduir aquests efectes i si en l'estratègia terapèutica d'administració a P1, on observàvem canvis importants en el contingut de metabòlits després una dieta alta en lisina en el nucli estriat, la teràpia seria també capaç de protegir de la homeòstasi redox. Vam escollir analitzar l'impacte de la teràpia avaluant un paràmetre de dany oxidatiu i un paràmetre relacionat amb la defensa antioxidant.

Així que en primer lloc vam estudiar els efectes sobre la peroxidació lipídica, un indicador del dany oxidatiu a les membranes lipídiques. Per això vam analitzar el contingut de malondialdehid (MDA) que és un dels compostos que es forma durant la peroxidació lipídica, considerat un indicador de lesió oxidativa de les membranes cel·lulars i que s'havia descrit alterat, principalment en escorça cerebral de ratolins KO exposats a una dieta alta en lisina ¹⁰⁶.

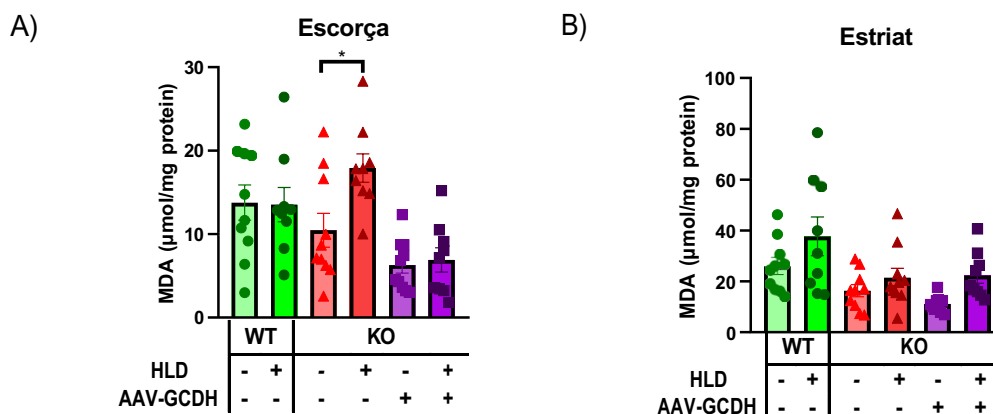


Figura 46: Anàlisi dels nivells de MDA en les estructures cerebrals de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes post-administració.

Els animals van ser tractats o no en el període neonatal (P1) amb el vector AAV-GCDH i exposats a una dieta estàndard (0,9%) o a una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies. N = 10 animals per grup. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. A) Nivells de MDA en escorça. B) Nivells de MDA en estriat.

L'anàlisi del contingut de MDA va revelar un increment del seu contingut en l'escorça dels ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a una dieta alta en lisina tal i com s'havia descrit prèviament ¹⁰⁶. En canvi, en els animals que havien estat tractats prèviament amb el vector AAV-GCDH, no s'observava la inducció de MDA i es mantenien els nivells de manera equivalent a com ho feien els ratolins control (Figura 46A). En realitzar la mateixa anàlisi en el teixit estriat no s'observaren canvis significatius en cap de les condicions (Figura 46B).

Com a paràmetre indicatiu de l'estat de les defenses antioxidants, vam escollir analitzar els nivells de glutatió (GSH) ja que davant de l'inductor d'estrès oxidatiu que representa una dieta alta en lisina per als ratolins *Gcdh*^{-/-}, s'havia descrit els nivells de GSH estaven disminuïts tant en escorça com en el nucli estriat ¹¹⁰.

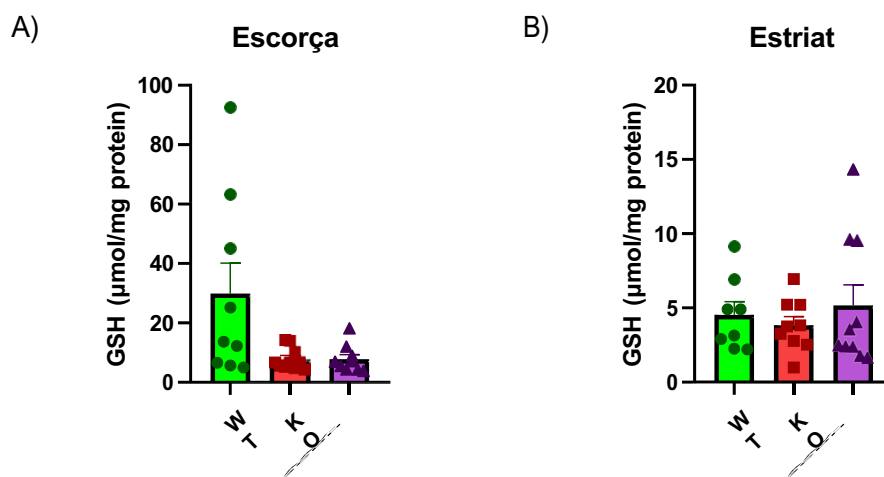


Figura 47: Anàlisi dels nivells de GSH les estructures cerebrals de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes post-administració

Els animals van ser tractats o no en el període neonatal (P1) amb el vector AAV-GCDH i exposats a una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies. N = 10 animals per grup. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. A) Nivells de GSH en escorça. B) Nivells de GSH en estriat.

L'anàlisi del contingut de glutatió va confirmar que hi havia una reducció en l'escorça dels ratolins *Gcdh* $-/-$ exposats a una dieta alta en lisina, però la teràpia no prevenia aquesta alteració (Figura 47A). Tanmateix no vam poder observar canvis de GSH en el nucli estriat en cap de les condicions analitzades (Figura 47B).

Seria interessant estudiar amb més detall i considerar un ventall més ampli de paràmetres implicats en l'estrès oxidatiu per poder treure'n conclusions més clares.

4.5 Estudi dels efectes d'una administració sistèmica neonatal, del vector AAV-*GCDH*, sobre les alteracions neuropatològiques dels ratolins *Gcdh* *-/-*.

Com a resultat de les crisis encefalopàtiques que poden patir els pacients AG1 si no es tracten, es produeix un dany estriatal amb afectació cortical i alteracions en substància blanca que acaben generant disfuncions motores greus i irreversibles. Entre les hipòtesis que podrien explicar els mecanismes cel·lulars s'ha proposat que les neurones estriatals podrien ser més susceptibles a la toxicitat dels metabòlits acumulats⁹⁰, però també que aquests metabòlits podrien provocar disfuncions en les cèl·lules de la glia, principalment en astròcits i això podria amplificar la degeneració estriatal.

En el model *Gcdh* *-/-* també s'han observat canvis neuropatològics de degeneració estriatal quan es sotmet els animals a l'estrès d'una dieta alta en lisina ¹⁶². En base a això vam decidir estudiar els efectes de l'administració del vector AAV-*GCDH* en el període neonatal sobre les alteracions neuropatològiques en el nucli estriat en ratolins *Gcdh* *-/-* ¹⁶⁰. Es varen avaluar possibles canvis morfològics o estructurals, anàlisi de poblacions cel·lulars i indicadors funcionals.

4.5.1 Estudi neuropatològic.

Aquests estudis s'han dut a terme en 8 grups d'animals. D'una banda ratolins WT i ratolins *Gcdh* *-/-* exposats a una dieta estàndard (SD, 0,9%) mantinguts en aquesta dieta 4 dies després del deslletament o 6 mesos, i sacrificats a l'edat d'un mes o 6 mesos. D'altra banda, ratolins *Gcdh* *-/-* tractats amb el vector AAV-*GCDH* a P1 o no tractats i exposats a una dieta alta en lisina (HLD, 4,7%) durant 4 dies o 6 mesos, i sacrificats a un mes o 6 mesos d'edat (Figura 48).

No tractat		Tractat (+AAV-GCDH)	
WT	<i>Gcdh</i> -/-		
WT + SD	<i>Gcdh</i> -/- + SD	<i>Gcdh</i> -/- + HLD	<i>Gcdh</i> -/- + HLD + AAV-GCDH

Dieta Estàndard



Dieta Alta en Lisina



Figura 48. Taula resum dels grups experimentals inclosos en l'estudi histopatològic del teixit estriatal.

Els animals varen ser mantinguts amb una dieta estàndard (SD) amb un contingut de lisina (0,9%) o amb una dieta alta en lisina HLD que conté un (4.7%) de lisina. (n= 3-6 ratolins/grup).

L'anàlisi morfològic del teixit estriatal, es va realitzar per tinció amb hematoxilina i eosina (H&E) en talls coronals. Els animals KO mantinguts en una dieta estàndard, tan a 1 com a 6 mesos d'edat mostraven una histologia similar a la dels ratolins control (WT). Tanmateix l'exposició dels animals KO a una dieta alta en lisina va donar lloc a canvis molt significatius, observant-se evidències de formació de vacuoles, després d'una exposició curta a la dieta en lisina, 4 dies, i de forma molt notable després de la dieta alta en lisina durant 6 mesos (Figura 49). Es interessant ressaltar que, el animals tractats amb el vector AAV-*GCDH* a l'edat de P1 per via intravenosa, presentaven una protecció en front la formació de vacuoles en ambdós períodes temporals d'exposició a la dieta, demostrant l'efectivitat de la teràpia.

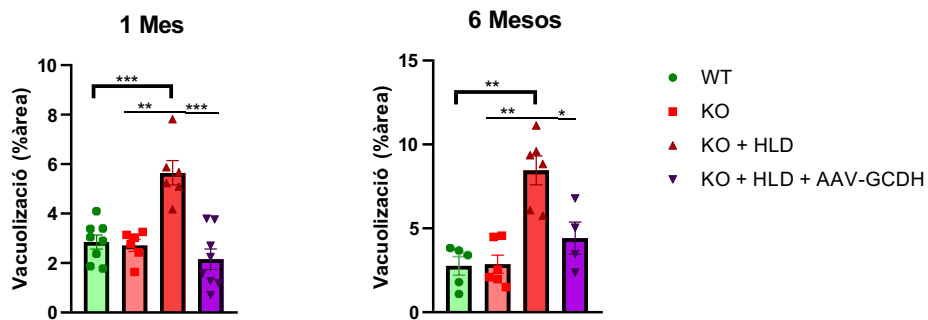
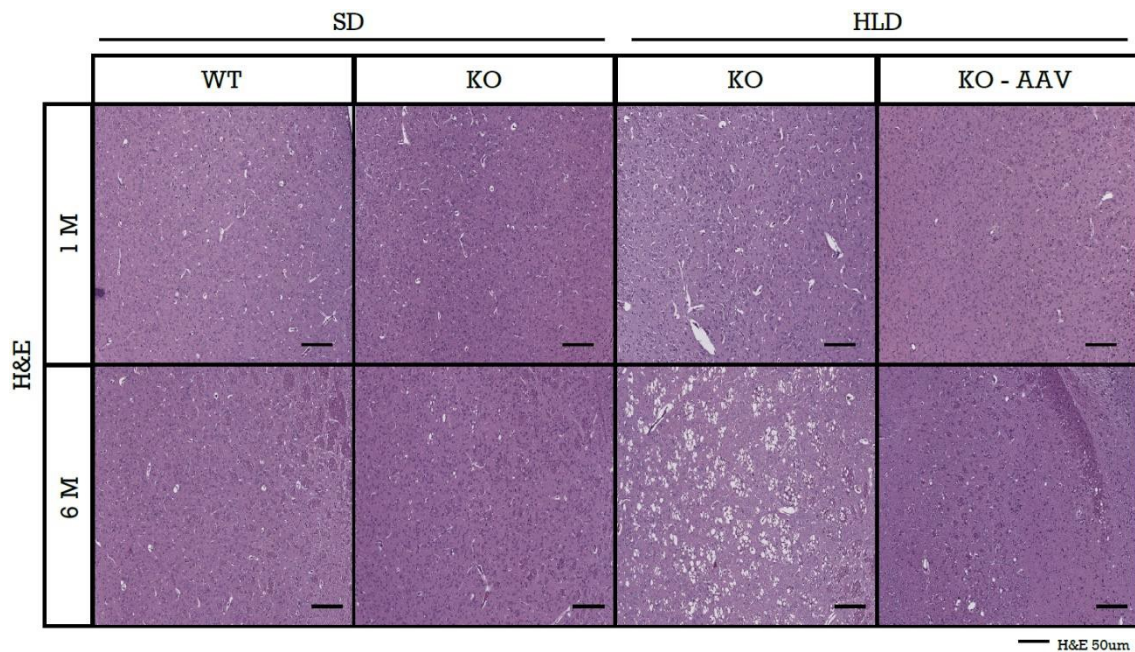
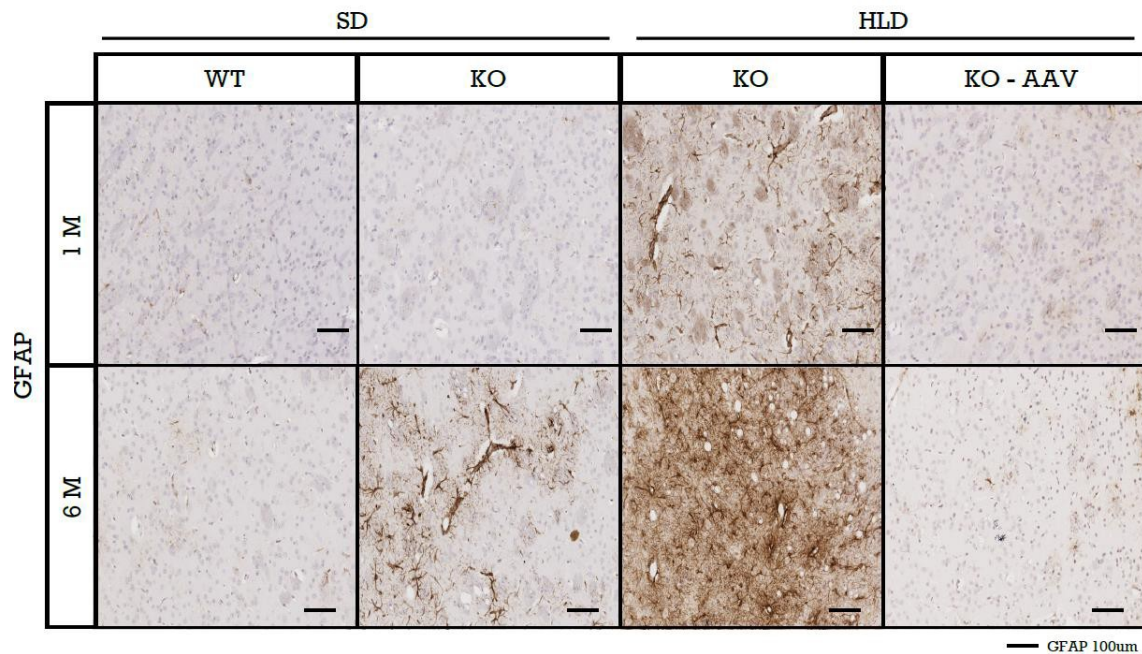


Figura 49: Anàlisi histopatològic del nucli estriat de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes i sis mesos després del tractament.

Tinció hematoxilina i eosina (H&E). Les imatges representen seccions coronals del nucli estriat (escala 50 μm). Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4,7% Lisina) durant 4 dies o 5mesos i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 4-8 animals per grup. La quantificació es va realitzar amb el programa QuPath-0.3.0. Les dades s'expressen com a mitjanes ± SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

Per tal d'aprofundir en els efectes de la teràpia sobre les alteracions neuropatològiques, vam dur a terme una caracterització d'algunes de les principals poblacions cel·lulars. En primer lloc ens vam centrar en les cèl·lules de la glia, més concretament de la macròglia, ja que s'havia descrit la presència de gliosi en els ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a dieta alta en lisina ⁹⁵. Aquest anàlisi es va realitzar a través d'una immunodetecció de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP), que és una proteïna que forma part del citoesquelet dels astròcits i es considera un bon marcador d'activació de les cèl·lules glials (Figura 50). Es va observar una immunoreactivitat lleu front a GFAP, en ratolins *Gcdh* ^{-/-} a l'edat de 6 mesos alimentats en dieta estàndard. L'exposició a una dieta alta en lisina, tan als 4 dies com als 6 mesos, mostrava una reactivitat més elevada, mostrant signes clars d'astroglïosi en els animals exposats a HLD durant 6 mesos. Es destacable que el tractament de AAV-*GCDH* protegia de la inducció de l'astroglïosi fins a 6 mesos post-administració, tot i estar en una exposició continuada de dieta alta en lisina (Figura 50).



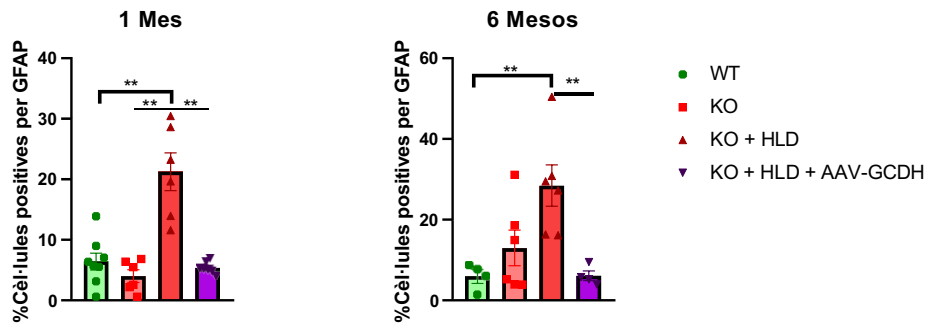


Figura 50: Anàlisi Immunohistoquímica del nucli estriat de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes i sis mesos després del tractament. Immunotinció de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP).

Les imatges representen seccions coronals del nucli estriat (escala 100 μ m). Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4,7% Lisina) durant 4 dies o 5 mesos i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 4-8 animals per grup. La quantificació es va realitzar amb el programa QuPath-0.3.0. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Un altre dels marcadors que vam estudiar va ser l'estat de la proteïna bàsica de la mielina (MBP) en aquest conjunt d'animals. L'MBP és una proteïna que participa en el procés de mielinització del sistema nerviós i que funciona principalment com a aïllant per augmentar i mantenir la velocitat de conducció dels potencials d'acció a través de l'axó. En estudis en ratolins *Gcdh*^{-/-} s'han observat alteracions en la mielinització de les neurones¹⁰⁵. A continuació vam procedir a la tinció per immunohistoquímica de MBP. Vam observar una immunotinció reduïda de MBP en els ratolins *Gcdh*^{-/-} en dieta SD, tan a l'edat de 1 mes com a 6 mesos, indicatiu d'una pèrdua de mielina en els ratolins KO. Aquesta pèrdua de mielina s'agreujava, en exposar els animals a una dieta alta en lisina tant a l'edat d'un mes com als 6 mesos. L'administració del vector terapèutic AAV-GCDH protegia de la pèrdua de mielina sobretot als 6 mesos de la teràpia (Figura 51).

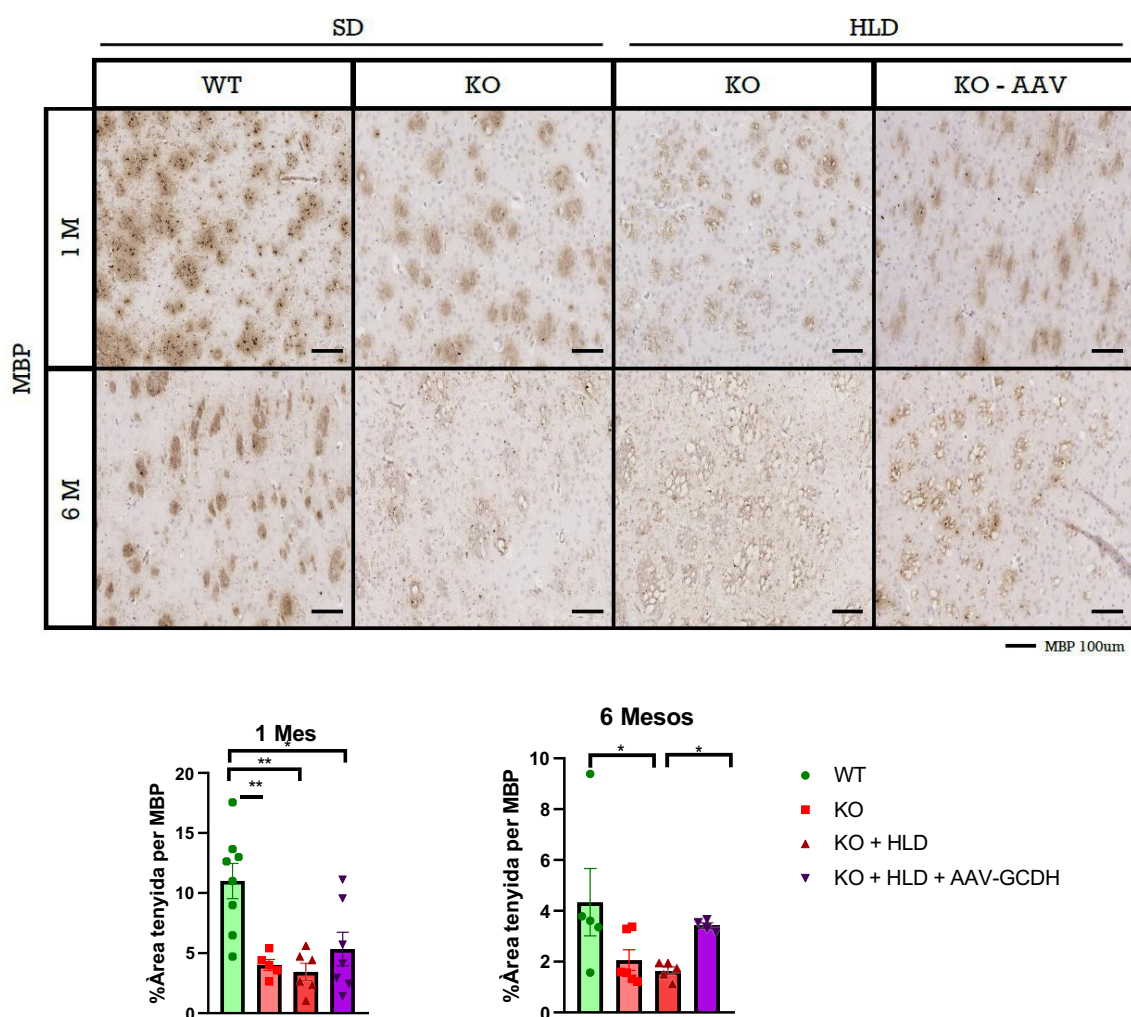


Figura 51: Anàlisi Immunohistoquímica del nucli estriat de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes i sis mesos després del tractament. Immunotinció de la proteïna bàsica de mielina (MBP).

Les imatges representen seccions coronals del nucli estriat (escala 100 μ m). Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies o 5 mesos i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 4-8 animals per grup. La quantificació es va realitzar amb el programa QuPath-0.3.0. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Els canvis en la mielinització feien pensar en una possible afectació neuronal, per això vam decidir analitzar possibles canvis en la densitat neuronal a través d'una anàlisi d'immunodetecció del marcador neuronal NeuN. En aquest cas no s'observaren canvis en el nombre de neurones en cap de les condicions estudiades (Figura 52). Suggestint que no hi hauria una pèrdua neuronal en el nucli estriat en aquesta finestra temporal. Tanmateix no podem descartar canvis en la funcionalitat de les neurones, com tampoc que els efectes sobre la supervivència neuronal poguessis ser detectables en etapes més tardanes.

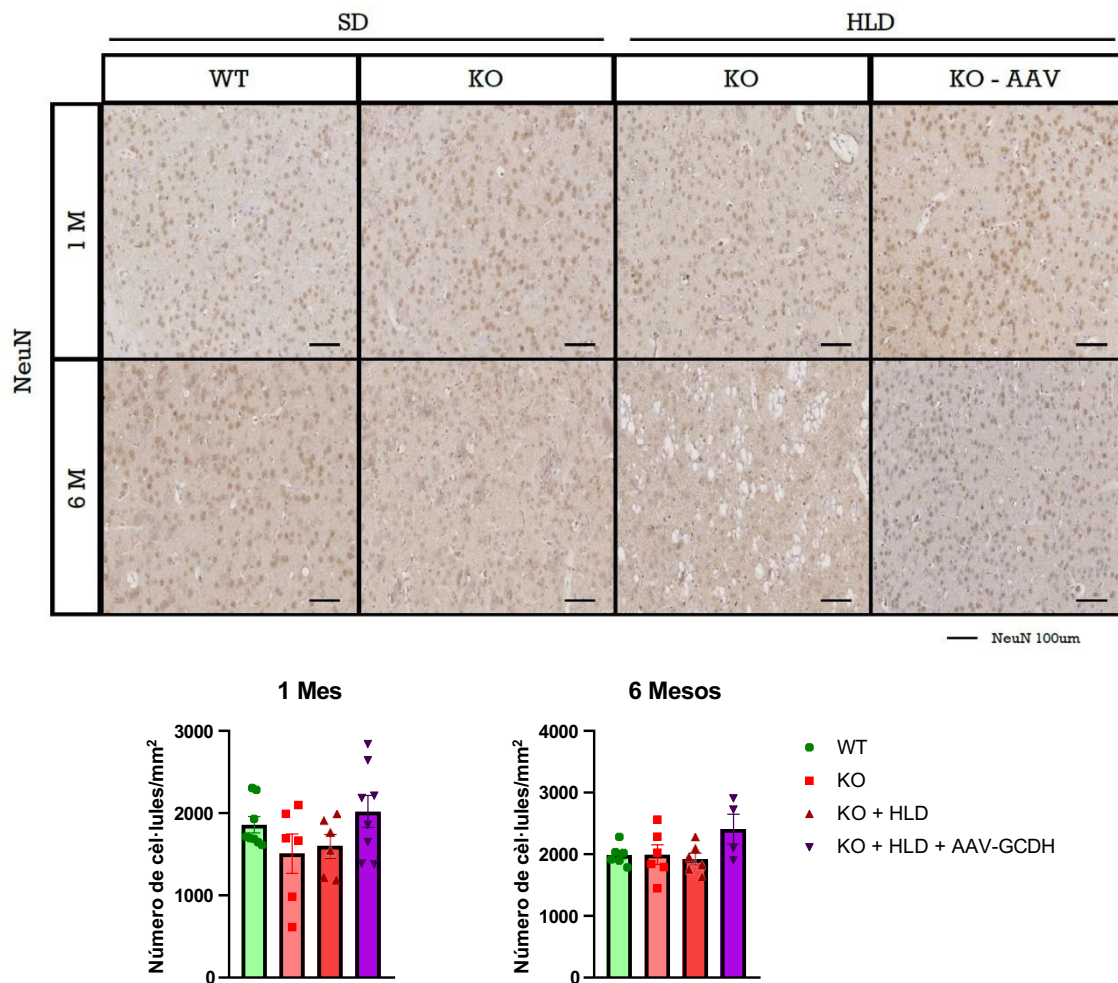


Figura 52: Anàlisi Immunohistoquímica del nucli estriat de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes i sis mesos després del tractament. Immunotinció de la proteïna neuronal NeuN.

Les imatges representen seccions coronals del nucli estriat (escala 100 um). Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies o 5mesos i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 4-8 animals per grup. La quantificació es va realitzar amb el programa QuPath-0.3.0. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues.

*P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

En resum, el que ens ha mostrat aquest estudi és que el tractament amb el vector AAV-*GCDH*, durant període neonatal protegeix de la formació de vacuoles, de la astrogliosis i de la pèrdua de mielina en el nucli estriat dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} sobretot quan s'alimenten amb una dieta alta en lisina.

4.5.2 Anàlisi per ressonància magnètica.

Tenint en compte les alteracions neuropatològiques observades i l'efecte protector de la teràpia ens va semblar interessant aprofundir en aquests aspectes a través d'anàlisi d'imatge per ressonància magnètica i l'anàlisi espectroscòpica de metabòlits en el nucli estriat. Aquests experiments es van dur a terme a la plataforma d'imatge de ressonància magnètica de l'IDIBAPS.

En aquest cas els experiments es van realitzar en ratolins WT i KO mantinguts en dieta estàndard i en ratolins KO exposats a la HLD durant 4 dies i tractats o no amb el vector AAV-*GCDH* a P1 per via intravenosa. Totes les anàlisi es van fer doncs en el grup de ratolins que tenia un mes d'edat.

Els metabòlits N-Acetilaspargat (NAA) i el seu derivat NAAG, es troben gairebé exclusivament en els mitocondris actius de neurones i axons i, per tant, són un marcador de la funció i integritat axonal i alteracions en el seu contingut s'associen a dany neuronal. De fet, els nivells reduïts de NAA suggereixen degeneració axonal o pèrdua axonal, o ambdues i es troben disminuïts en pacients amb acidúria glutàrica tipus 1 ^{48,163,164}.

En realitzar l'anàlisi d'espectroscòpia de NAA i NAAG vam observar que el seu contingut tendia a ser més reduït en ratolins *Gcdh* ^{-/-} sota una dieta estàndard i que en una dieta alta en lisina, aquesta reducció era estadísticament significativa, mentre que el tractament amb el vector terapèutic protegia de la forta disminució provocada per la HLD (Figura 53). Aquests resultats confirmarien una lesió neuronal tot i no comportar una pèrdua de les neurones tal i com suggerien els resultats d'immunotinció amb NeuN.

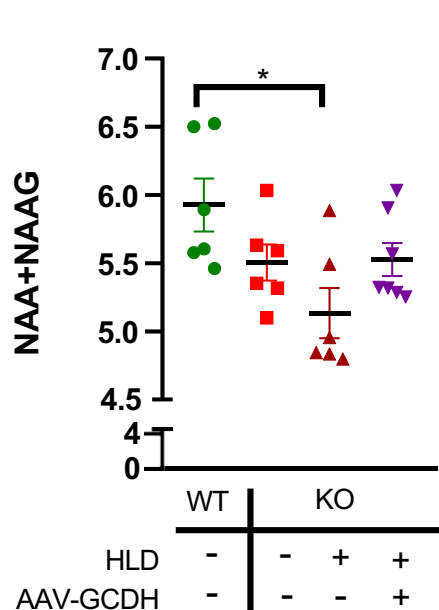
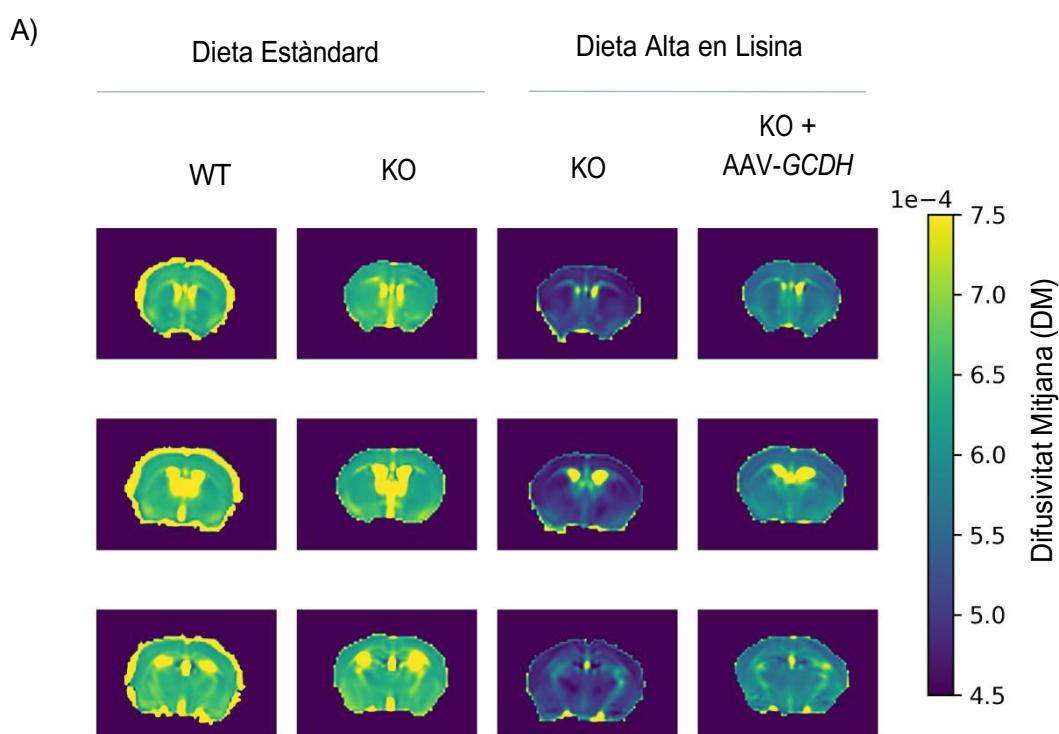


Figura 53: Anàlisi mitjançant l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear d'hidrogen (^1H RMN) dels nivells de N-Acetilaspargat en el nucli estriat de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes post-administració.

Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 6-7 animals per grup. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar

L'anàlisi per RMN de tot el cervell ens permet avaluar diferents paràmetres. En primer lloc vam analitzar la difusivitat mitjana que és una mesura escalar de la difusió total de les molècules en una estructura 3D, i es un terme que, a més a més, s'ha vist alterat en pacients d'acidúria glutàrica tipus 1¹⁶⁵ (Figura 54).



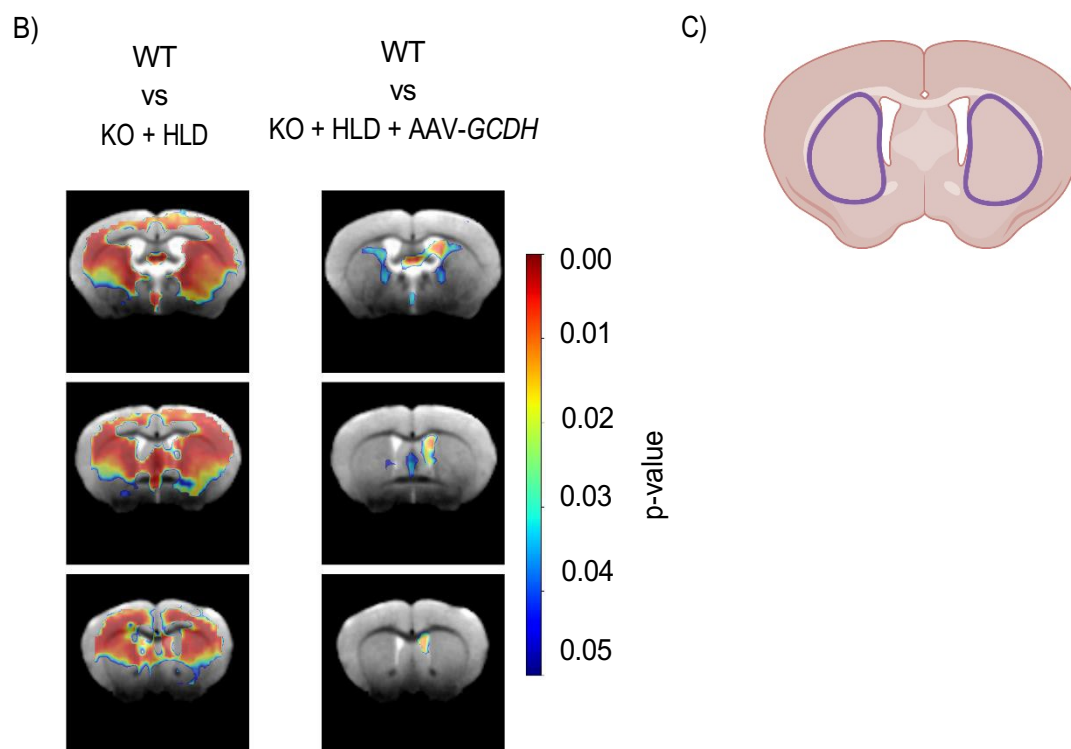


Figura 54: Imatges representatives de ressonància magnètica (RMN) del cervell de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes post-administració. Avaluació de la difusivitat mitjana.

Les imatges representen seccions coronals del nucli estriat. Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-GCDH a P1 per via intravenosa. N = 6 animals per grup. Anàlisi basada en mapes de difusió mitjana estimat a partir de la ressonància magnètica de difusió. Anàlisi realitzada per la plataforma d'imatge de ressonància magnètica de l'IDIBAPS. A) Difusivitat mitjana. B) Anàlisi del p valor de la difusivitat mitjana. C) Esquema representatiu marcat amb morat de localització de l'estriat en els talls coronals.

L'anàlisi de neuroimatge en el cervell de ratolins *Gcdh* ^{-/-} en SD, mostrava un patró molt similar al dels animals control. Tanmateix, l'exposició dels animals a una dieta alta en lisina, donava lloc a una reducció en la difusivitat mitjana. Aquesta reducció era molt menor quan aquests animals havien estat prèviament tractats amb el vector terapèutic AAV-GCDH en l'etapa neonatal. Suggestint l'efecte protector de la teràpia en front de la pèrdua de difusivitat mitjana (Figura 54A).

Es va procedir a un anàlisi comparatiu per superposició d'imatges i un càlcul estadístic. En aquests anàlisi es van obtenir diferències significatives al comparar els ratolins control exposats a una dieta estàndard i els ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a una dieta alta en lisina. Aquests eren els dos grups més diferenciats mostrant valors de significança en la difusivitat mitjana, fonamentalment en la regió de l'estriat i en algunes regions corticals. La superposició d'imatges dels ratolins control exposats a una dieta estàndard amb la dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} tractats amb el vector AAV-*GCDH* i exposats a una dieta alta en lisina, presentaven únicament algunes diferències en la regió ventricular, suggerint que aquests dos grups eren força similars entre ells, i mostrant un efecte protector de la teràpia (Figura 54B).

El segon paràmetre que es va examinar a través de l'estudi de RMN, va ser l'organització dels tractes axonals. Es va definir un mapa de densitat de fibres per tal d'identificar possibles afectacions en l'estructura i el nombre d'axons (Figura 55).

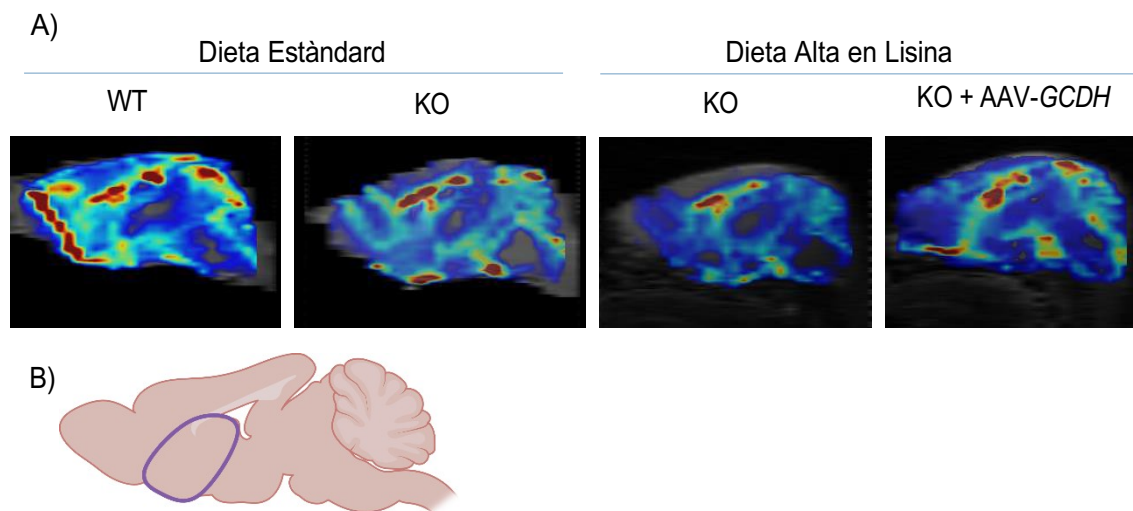


Figura 55: Imatges representatives de RMN del cervell de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-*GCDH* un mes post-administració. Mapa de densitat de fibres.

Les imatges representen seccions sagitals del cervell dels ratolins. Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-*GCDH* a P1 per via intravenosa. N = 6 animals per grup. Anàlisi basada en mapes de densitat fibril·lar que mostra el nombre de línies aerodinàmiques reconstruïdes per tractografia basada en ressonància magnètica de difusió que travessen cada vòxel. Anàlisi realitzada per la plataforma d'imatge de ressonància magnètica de l'IDIBAPS. A) Mapa de densitat de fibres. B) Esquema representatiu marcat amb morat de localització de l'estriat en els talls sagitals.

El color dels vòxels de la imatge està relacionat amb la densitat de les fibres identificades, essent els punts de major densitat de fibres més vermella i menor densitat més blau. L'anàlisi de les imatges sagitals va evidenciar en primer lloc que els ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a una dieta estàndard, mostraven una tendència de menor densitat de fibres respecte els ratolins control que era més notable en els animals exposats a la dieta alta en lisina. Aquesta pèrdua es va localitzar sobretot en estriat i en la regió de connexió d'aquest amb l'escorça motora. El tractament amb el vector AAV-GCDH, una vegada més mostrava un efecte protector, essent la pèrdua de densitat de fibres dels tractes axonals menor en aquests animals.

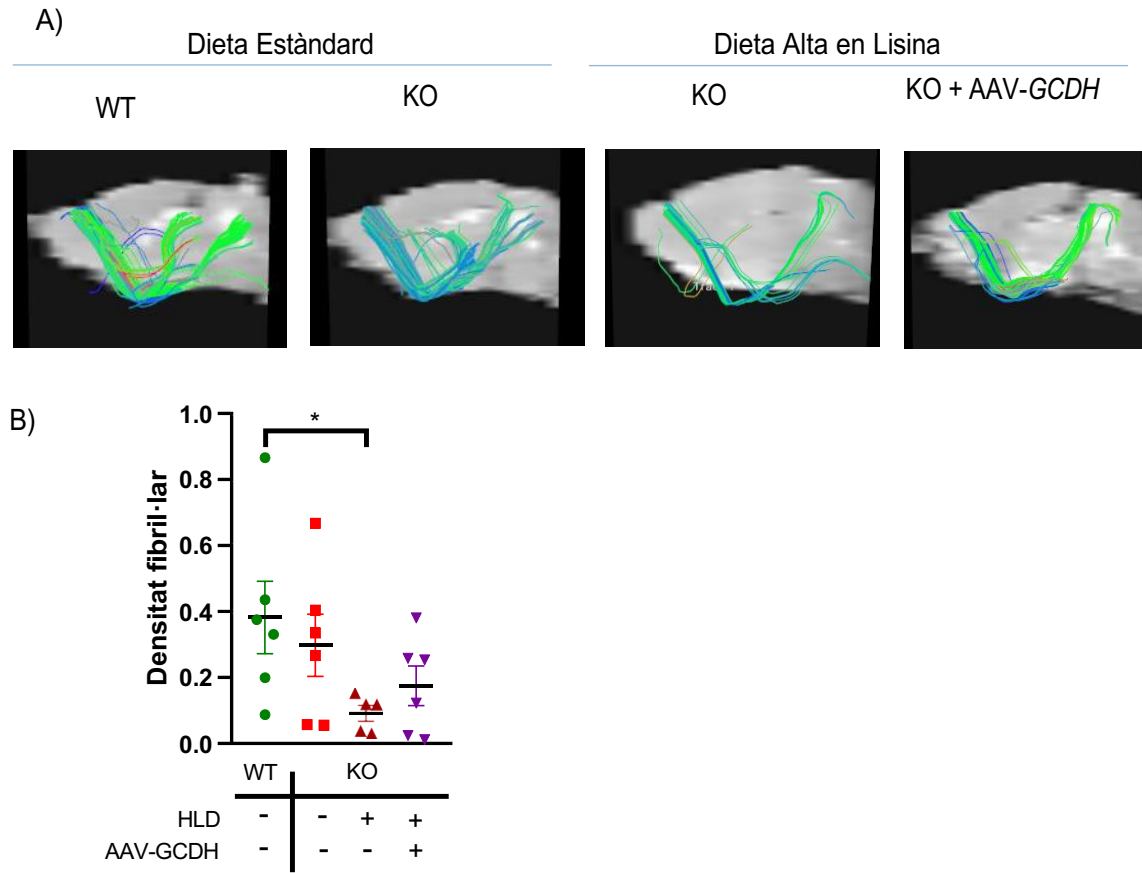


Figura 56: Imatges representatives de RMN del cervell de ratolins exposats a SD o HLD i tractats o no amb el vector AAV-GCDH un mes post-administració. Mapa de densitat de fibres. Quantificació de les fibres del tracte motor de l'estriat.

Les imatges representen seccions sagitals del cervell dels ratolins. Els animals van ser exposats a dieta estàndard (0,9%) o una dieta alta en lisina (4.7% Lisina) durant 4 dies i/o tractats amb el virus terapèutic AAV-*GCDH* a P1 per via intravenosa. N = 6 animals per grup. Anàlisi basada en el tracte motor-estriatal que es va obtenir a partir de la tractografia del cervell sencer de fibres que comencen/acaben a l'escorça motora i creuen la regió estriatal. Anàlisi realitzada per la plataforma d'imatge de ressonància magnètica de l'IDIBAPS. A) Imatge dels grups d'axons del tracte motor de les fibres que passen per l'estriat. B) Quantificació de la densitat fibril·lar del tracte motor estriatal. Les dades s'expressen com a mitjanes $\pm$ SEM. La significança es va avaluar mitjançant una prova de Mann-Whitney de dues cues. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

Finalment, es va procedir a fer un estudi de tractografia per tal de quantificar el nombre de fibres que des de l'escorça motora travessaven per l'estriat. En aquests anàlisi es va observar una reducció en el nombre de fibres en ratolins *Gcdh* $-/-$ respecte els ratolins controls mantinguts en dieta estàndard. Aquesta disminució era estadísticament significativa en els ratolins *Gcdh* $-/-$ exposats a la dieta alta en lisina, mentre que la teràpia amb el vector AAV-*GCDH* frenava la pèrdua de les fibres axonals (Figura 56A, 56B).

En conjunt, l'estudi per RMN mostrava que l'exposició dels ratolins a una dieta alta en lisina provocava un dany neuronal en els ratolins *Gcdh* $-/-$ i que la teràpia gènica amb el vector AAV-*GCDH* presentava un efecte protector.

4.5.3 Estudi de supervivència.

En els primers estudis de sotmetre els animals a una dieta alta en lisina ja havíem observat l'impacte que tenia en la supervivència dels animals, sobretot quan aquests eren sotmesos a la dieta just després del deslletament. Altres autors també havien descrit prèviament l'impacte de la dieta en la vida d'aquests animals ⁹⁵. I de fet també s'ha descrit una alta mortalitat, en pacients, en absència de tractament ⁶³.

En base a això vam decidir realitzar un estudi sobre l'impacte de la teràpia neonatal del vector AAV-*GCDH* quan s'administra per via intravenosa en la supervivència dels animals al llarg de 150 dies.

L'exposició dels ratolins *Gcdh*^{-/-} a una dieta alta amb lisina va evidenciar que durant els 10 primers dies es perdien el 40% dels animals i que la mortalitat anava incrementant fins que al voltant dels 100 dies s'estabilitzava amb una pèrdua global del 60% dels animals (Figura 57). L'administració del vector terapèutic AAV-*GCDH* en període neonatal P1 va mantenir el 100% dels animals en vida, tot i l'exposició continuada a la dieta alta en lisina.

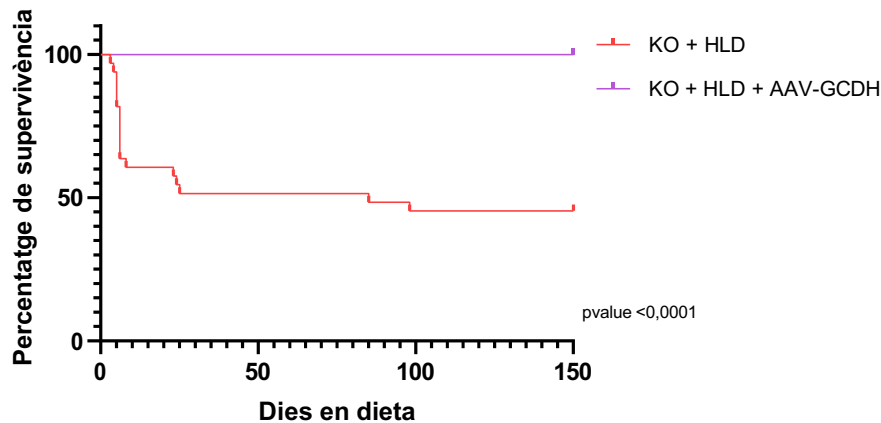


Figura 57: Anàlisi de supervivència de ratolins *Gcdh*^{-/-} (KO) exposats a una dieta rica en lisina durant 5 mesos i tractats o no amb el vector AAV-*GCDH* a través d'una administració intravenosa a P1.

Administració intravenosa a P1 del vector AAV-*GCDH* a la dosi de (1×10^{11} gv/ratolí) (n=25) o solució salina (n=33). A les 3 setmanes es van exposar a HLD durant 5 mesos. La supervivència dels ratolins es va analitzar pel mètode Kaplan-Meier i es va avaluar la significança amb el test de rang llarg (Mantel-Cox).

En conjunt, els resultats preclínic obtinguts en aquest estudi suggereixen que el tractament intravenós amb el vector AAV-*GCDH* en les primeres etapes del desenvolupament, proporciona un benefici terapèutic en el model de ratolí d'acidúria glutàrica.

5. Discussió.

L'acidúria glutàrica tipus 1 és una malaltia metabòlica de la via catabòlica de la lisina, la hidroxilisina i el triptòfan, que és causada per mutacions en el gen de la GCDH. Aquestes mutacions patogèniques causen la deficiència de glutaril-CoA deshidrogenasa i el seu defecte enzimàtic provoca l'acumulació d'àcid glutàric, àcid 3-hidroxi glutàric i glutarilcarnitina en teixits i fluids corporals. Clínicament, els pacients amb AG1 presenten macrocefàlia, distonia progressiva, discinèsia i gran part del pacients desenvolupen crisis encefalopàtiques durant els 3 primers anys de vida. Actualment el tractament per aquest pacients consisteix en una restricció dietètica de lisina amb suplementació de carnitina. Però aquesta teràpia i el tractament d'emergència durant les crisi catabòliques són efectius només per a algunes persones. Malauradament, un terç dels nens afectats no responen a la teràpia i experimenten danys cerebrals irreversibles, com la degeneració estriatal, malgrat la gestió clínica ^{25,55}.

L'avenç en la teràpia gènica mitjançant els virus adeno-associats ha experimentat un repunt en les últimes dècades, emergint com una eina potent per al tractament de diverses malalties genètiques. Els AAVs són vehicles virals utilitzats per a lliurar material genètic terapèutic als teixits diana de les malalties d'interès. Aquesta tecnologia ha experimentat avenços importants que l'han portat a la seva implementació en diverses teràpies innovadores. Han demostrat tenir un perfil de seguretat acceptable i en el conjunt d'assajos clínics han mostrat baixa genotoxicitat. Es dona una resposta immune principalment front a les càpsides virals que es pot controlar amb un règim de corticoesteroides, basats principalment en Prednisolona. Dades clíniques recollides de més de 3000 pacients al llarg de 20 anys indiquen que la teràpia gènica amb AAVs és segura, es tolera bé i ha mostrat eficàcia per algunes malalties ¹⁶⁶. Els AAVs han obert també noves vies per al tractament de malalties hereditàries brindant un gran potencial per millorar la qualitat de vida dels pacients, oferint noves perspectives ^{135,140}.

En l'estudi actual s'ha explorat el potencial terapèutic d'una teràpia gènica basada en la transferència del gen *GCDH* humà amb un vector adenoassociat i s'ha estudiat la seva eficàcia en un model preclínic murí per a l'AG1. Aquesta teràpia ha afrontat el repte de restaurar la funció de GCDH als òrgans diana i protegir les lesions cerebrals, mitjançant un enfocament mínimament invasiu.

5.1 Disseny i construcció del vector.

En el disseny del vector és important tenir en compte d'una banda la càpside del virus que guiarà el tropisme així com el casset d'expressió que ha de permetre l'expressió del transgèn. Es va escollir el AAV9 ja que a diferència de la resta de serotips es capaç de creuar la barrera hematoencefàlica. A més a més no només transdueix neurones, sinó que es capaç de transduir cèl·lules no neuronals com els astròcits ¹³⁵, que tenen un important paper en l'acidúria glutàrica tipus 1 ⁹⁰.

A l'hora de dissenyar el casset d'expressió, es va decidir utilitzar la seqüència humana de la GCDH, donat que en cas d'obtenir resultats positius, seria més fàcil avançar en les diferents fases per a la translació a la clínica. La possibilitat de fer aquest pas tot i difícil calia tenir-lo en compte ja que de productes de teràpia gènica amb AAV per a malalties rares que contenen gens humans n'hi ha 6 que han estat ja aprovats per la EMA ¹⁵⁴.

El segon factor que es va tenir en compte a l'hora de dissenyar el casset d'expressió, va ser el promotor. La selecció d'un promotor adequat en la construcció del vector AAV és crucial per garantir que el gen terapèutic s'expressi de manera eficient en les cèl·lules diana. El tipus de promotor determinarà en gran mesura l'expressió del gen terapèutic i per tant, la seva eficàcia, ^{159,167}. Característiques com la capacitat de transcripció, que els podria classificar en promotors forts o febles, l'especificitat tissular o fins i tot la seva activitat en diferents tipus cel·lulars són elements a tenir en compte en el moment del disseny. Els promotors PGK ¹⁵⁷, i CAG ¹⁵⁹ s'han descrit com a promotors feble i fort respectivament i de fet els nostres resultats ho confirmen ja que els nivells de GCDH assolits amb el vector AAV-GCDH van ser en tots els teixits superiors al vector AAV-P-GCDH. En principi cap dels dos promotors té una especificitat tissular però en un estudi comparatiu recent s'han observat diferències en la seva capacitat per controlar l'expressió en diferents tipus cel·lulars en teixit nerviós. Tot i que ambdós promotors permeten l'expressió a neurones, el promotor PGK seria més eficient en neurones corticals. Tanmateix, el promotor PGK no dirigeix l'expressió en astròcits ¹⁵⁹. Tot i que nosaltres no hem realitzat un estudi detallat del subtipus cel·lular en el que s'expressa sí que és fonamental poder restablir l'expressió de GCDH en astròcits ja que aquests tenen un paper important en els patomecanismes implicats en AG1 ¹⁶². De fet altes concentracions de lisina en diferents models d'astròcits deficients en GCDH han mostrat canvis cel·lulars en estrès oxidatiu, un fenotip hiperactiu i hipertròfic, provocant una astrogliosis crònica que acaba contribuint a la mort neuronal ¹⁶². En aquest sentit, vehicular l'expressió de GCDH en astròcits a través el promotor CAG podria minimitzar aquesta resposta.

El vector *AAV-GCDH*, a més a més, conté un element regulador post transcripcional anomenat WPRE que prové del WHV (virus de l'hepatitis de la marmota), que estabilitza i millora l'expressió del transgèn ¹⁶⁸. Fent així que això també pogués estar afectant a la millora en la transducció del vector.

El disseny del vector *AAV-GCDH* contindria doncs diferents elements que el farien millor candidat. De fet, en l'anàlisi del contingut de C5DC ambdós vectors van reduir l'acumulació del metabòlit de forma similar tot i aconseguir una expressió de GCDH un 60% superior amb el vector *AAV-GCDH*, però la reducció en els metabòlits alliberats al sèrum va ser superior per part del vector *AAV-GCDH*. En teixit nerviós només es va aconseguir disminuir el contingut en C5DC amb el vector *AAV-GCDH*, d'acord amb una expressió més alta de la proteïna. Tenint en compte, que el promotor CAG vehicula l'expressió de transgens tant a neurones com a astròcits es podria especular que la reducció en C5DC podria tenir lloc en els dos tipus cel·lulars.

5.2 Transducció als teixits diana: fetge, ronyó i teixits neuronals.

El gen GCDH s'expressa en la majoria dels teixits de l'organisme i la proteïna funcional es localitza en la matriu mitocondrial ¹⁶⁹. La seva absència desencadena una sèrie de efectes patològics que principalment afecten al sistema nerviós central ^{70,170} però també s'han descrit alteracions renals que es manifesten amb una insuficiència renal crònica amb disminució de la filtració glomerular, conforma avança l'edat dels pacients ¹⁷⁰. En aquest escenari es va escollir inicialment explorar una administració intravascular, consistent en la injecció intravenosa, al tractar-se d'una via poc invasiva i que hauria de facilitar que la GCDH pogués arribar tant a teixit perifèrics com a SNC. Tot i que el AAV9 s'ha descrit capaç de creuar la BHE ¹⁶¹, els nivells de transducció no són molt alts i vam voler explorar l'administració en etapes del desenvolupament postnatal en les que la BHE no està del tot formada, com serien P1 i P15, a diferència de l'edat de P30 o adult-jove on la BHE ja està constituïda. Estudiar els efectes d'una administració en l'etapa neonatal com P1 també representava una altra potencial avantatge, com seria el avaluar els efectes d'un tractament prèviament al desenvolupament de les lesions principals. De fet, idealment, un tractament per l'AG1 s'hauria d'iniciar en edats molt joves per tal de prevenir el desenvolupament de les crisi encefalopàtiques que després condueixen a danys pràcticament irreversibles. El fet que el diagnòstic es coneix des de molt aviat, al formar part dels programes de cribatge neonatal a Espanya, permetria l'aplicació en edats primerenques.

En estudis preclítics s'ha observat que l'administració primerenca d'una teràpia amb AAV pateix un efecte de dilució en el temps, conforma té lloc el creixement dels diferents òrgans per això vam decidir aplicar una dosi inversament proporcional a l'edat de l'animal, $5 \cdot 10^{13}$ vg/kg a P1, 10^{13} vg/kg a P15 i $5 \cdot 10^{12}$ vg/Kg a P30, i sempre dins dels rangs que responen a un perfil de seguretat¹⁷¹. En els assaigs clínics amb AAV actualment les administracions, sistèmiques comprenen un rang de dosi que oscil·la entre $5 \cdot 10^{11}$ vg/kg fins a $2,5 \cdot 10^{15}$ vg/kg, essent en el 62% dels estudis dosis entre $1,4 \cdot 10^{12}$ – $1,4 \cdot 10^{14}$ vg/kg ¹⁷².

L'administració del vector AAV-GCDH va donar lloc a la transducció de les estructures cerebrals analitzades com l'escorça i el nucli estriat detectant-se un nombre de genomes virals, en les administracions a P1 i P15, unes 10 vegades superior respecte l'administració a P30 que correlacionava amb una expressió de GCDH més alta a P1 i P15, assolint quantitats de GCDH similars al dels ratolins control o fins i tot superiors a P1. Aquests resultats estarien d'acord amb la transducció limitada del AAV9 al SNC en ratolins adults-joves, en comparació amb l'efecte generalitzat en nounats ^{155,156}. A més a més, els canvis en el desenvolupament de l'estructura de la barrera hematoencefàlica farien que durant l'administració a través de la vena temporal en

nounats, l'AAV9 creui un endoteli immadur i es difongui a través d'una matriu extracel·lular laxa que li permetria transduir neurones, astròcits i micròglia. En adults, en canvi, l'endoteli cerebral es converteix en una barrera estreta envoltada per astròcits on l'AAV9 encara pot creuar l'endoteli cerebral, però no la barrera glial, transduint així principalment alguns astròcits i algunes cèl·lules endotelials, però molt poques neurones o cèl·lules de la micròglia ^{155,161}. L'expressió de GCDH a P1 es mantenia en escorça i nucli estriat fins a 6 mesos post-tractament, tot i observar-se una reducció en el nombre de genomes virals. A més a més la GCDH era funcional ja que tant a 1 mes com a 6 mesos post-tractament es podia detectar la seva activitat. En canvi, després d'una administració a P30 tot i detectar una certa expressió de la proteïna, no vam poder validar la seva activitat, potser per la sensibilitat de l'assaig, però en qualsevol cas totes les anàlisis apuntaven que l'administració a P1, després d'una injecció sistèmica era clarament la via més eficient per transduir el teixit nerviós.

La transducció a ronyó va mostrar un comportament molt diferent a l'observat en SNC. S'ha reportat que les eficiències de transducció dels AAVs a ronyó són extremadament baixes en qualsevol dels tipus cel·lulars cèl·lules tubulars, vasculars, glomerulars o intersticials ¹⁷³. Malgrat això, l'administració intravenosa a P30 va permetre assolir nivells de GCDH d'un 50% el dels ratolins control que, tot i patir una reducció, era força estable als 6 mesos post-tractament. Tanmateix, després d'una administració a P1 i P15 els nivells de GCDH eren substancialment inferiors i pràcticament indetectables als 6 mesos d'una injecció a P1.

Tot i que en AG1 no s'ha descrit una patologia hepàtica, el fetge és un òrgan important en la metabolització de la lisina i en absència de GCDH també té lloc un cúmul de metabòlits en el teixit que en part son alliberats a torrent sanguini. Alguns autors han proposat que la correcció metabòlica a fetge podria ser suficient o si més no contribuir a reduir el contingut de metabòlits i per tant millorar la patologia. En aquest sentit, un trasplantament hepàtic podria ser una estratègia terapèutica ¹¹⁶. Per això era important analitzar la transducció hepàtica amb el vector AAV-*GCDH*. En fetge, a totes les etapes es va observar una bona expressió de GCDH, tot i que als 6 mesos post-tractament l'administració a P1 mostrava una caiguda important d'expressió que era molt inferior després d'una administració a P30. Això, probablement, responia a l'efecte de dilució del vector a causa del desenvolupament del fetge ¹⁷⁴, que evidentment és superior en l'estratègia neonatal, ja que contempla el desenvolupament d'un fetge des de el dia 1 postnatal fins a 6 mesos d'edat. Tot i així, el restabliment de l'activitat enzimàtica es va detectar tant un mes després del tractament com en els animals de 6 mesos que havien rebut la teràpia a P1 com a P30.

Hi hauria doncs un efecte sobre la transducció associat a l'edat de l'animal, de manera que l'administració a P1 permetria una bona transducció a teixit nerviós, mentre que l'estratègia de P30 seria més adequada per arribar a teixits perifèrics. L'administració a P15 donava un patró intermig sense destacar en cap dels teixits analitzats. Cal tenir en compte també el efecte dosi ja que els animals injectats a P30 rebien una dosi de vector 10 vegades inferior a P1, tot i així la transducció a teixits perifèrics era superior a P1. Probablement, es podria explorar l'administració de dosis més altes en el cas de P30, per analitzar si s'assoleixen valors de transducció superiors a SNC. De totes formes, creiem que les limitacions associades a la BHE continuarien dificultant assolir una bona expressió de GCDH .

Per sobrepassar aquesta limitació hem valorat l'administració locoregional a cisterna magna, ja que s'ha descrit com una tècnica segura, fiable i menys invasiva, en comparació amb altres tècniques d'administració al SNC, com podria ser l'administració intraventricular. Les dosis es van mantenir com en l'estratègia intravenosa, 10^{13} vg/kg a P15 i $5 \cdot 10^{12}$ vg/Kg a P30, per tal de poder ser directament comparables, tot i estar en un rang alt de dosis per una administració locoregional ¹⁷².

En administrar el vector *AAV-GCDH* a través de la cisterna magna, també s'observa major transducció a P15 que a P30 tant a escorça com a nucli estriat, és a dir millor transducció quan s'administra el vector en etapes més primerenques. Evidentment, aquí podríem tenir un efecte de dosis però també hi podria contribuir el fet que la matriu extracel·lular en els cervells dels ratolins joves és laxa i per tant hi ha una millor transducció en general en les cèl·lules del cervell¹⁶¹.

Ara si comparem l'administració locoregional i la intravenosa en la mateixa etapa del desenvolupament, P15 i a la mateixa dosi, es va observar que l'administració a cisterna magna, donava lloc a una major transducció en escorça i nucli estriat, d'acord amb una major concentració del vector en la zona ¹⁷⁵. Tanmateix al comparar l'administració a cisterna magna P15 amb la via intravenosa, P1, s'observà major expressió de GCDH en ambdues regions cerebrals després de l'administració a P1. Una vegada més hi hauria un efecte de dosi. A la vista d'aquests resultats probablement una administració a P1 a cisterna magna permetria assolir millor transducció i més expressió de GCDH.

De totes les estratègies estudiades l'administració intravenosa a P1 ens aportava nivells de transducció i expressió de GCDH prou elevats com per considerar aquesta via per valorar el seu potencial terapèutic. A més a més també teníem una transducció a fetge que potencialment podria contribuir a la correcció fenotípica i era una aproximació poc invasiva que sempre facilita la seva translació a pacients. Per altra banda l'administració intravenosa en edats més avançades P30 transduïa eficientment els òrgans perifèrics i això ens permetia valorar l'impacte que podria tenir la teràpia quan la correcció es restringia a aquests òrgans. Tots aquests factors ens van fer escollir aquesta estratègia.

5.3 Correcció de les alteracions fenotípiques en el model murí de AG1

Els ratolins *Gcdh*^{-/-} tenen un fenotip més lleu si no se'ls exposa a una dieta alta en lisina. Si que recapitulen el fenotip bioquímic, com els pacients humans amb AG1, amb nivells elevats d'àcid glutàric i d'àcid 3-OH-glutàric en orina i cervell, i alts nivells de C5DC en sèrum, i una mielopatia espongiforme difusa. Però no presenten el complex fenotip neurològic clínic dels pacients amb AG1, només presenten un dèficit motor lleu ⁵¹.

L'exposició a la lisina en la dieta alta en lisina en ratolins *Gcdh*^{-/-} desencadena un fenotip sever que s'aproxima molt més al fenotip de l'acidúria glutàrica tipus 1. Alimentar els ratolins *Gcdh*^{-/-} amb una dieta alta en lisina comporta un augment del contingut de metabòlits C5DC, GA i 3-OHGA als teixits. Aquesta acumulació dels metabòlits desencadena alteracions bioquímiques i neuropatològiques en els animals knock-out que recapitulen el fenotip humà ^{51,95,101,106}. Curiosament, es va observar un fenotip empitjorat quan els ratolins estaven exposats a una dieta alta en lisina immediatament després del deslletament. En aquestes condicions, es va observar una mobilitat reduïda i moviments anormals amb convulsions com a conseqüència directa de l'exposició a la dieta. Aquests resultats suggereixen que l'exposició de ratolins *Gcdh*^{-/-} a una dieta alta en lisina desencadena una exacerbació del fenotip *Gcdh*^{-/-}, especialment quan els animals s'alimenten a edats molt joves.

Aquestes alteracions observades en els ratolins *Gcdh*^{-/-} amb una dieta alta en lisina s'assemblen molt a les crisis encefalopàtiques que es produeixen en pacients amb AG1. Es creu que l'augment de GA i 3-OHGA desencadena el dany estriatal. De fet, s'ha proposat que la síntesi intracerebral *de novo* és l'origen de la seva acumulació al SNC dels pacients amb AG1 ⁵⁴. Diversos autors han demostrat que hi ha un flux limitat de metabòlits GA i 3-OHGA que travessen la barrera hematoencefàlica ^{54,98}. En conseqüència, prevenir l'augment de metabòlits sintetitzats a l'estriat, tal com mostren les dades, és clau per protegir-se del dany cerebral.

La dieta alta en lisina empitjora el fenotip del ratolins *Gcdh*^{-/-} sobretot quan estan exposats a aquesta durant un llarg període de temps ¹¹². La teràpia aplicada als animals adult-joves exposats a una dieta alta en lisina no va ser capaç de prevenir l'increment dels metabòlits. Els nivells C5DC, GA i 3-OHGA només van ser reduïts en fetge i sèrum quan els ratolins tractats a P30 estaven sota dieta estàndard.

En canvi, en l'estratègia de nounats, es va aconseguir una reducció en el contingut dels metabòlits principalment en el nucli estriat del cervell, suggerint un efecte protector de la teràpia. L'administració neonatal d'AAV-GCDH va evitar l'acumulació de GA, 3-OHGA i CD5C després d'una exposició a HLD durant 4 dies en ratolins *Gcdh* ^{-/-}, assolint nivells similars als animals WT. També es va obtenir una reducció estadísticament significativa en els nivells de metabòlits quan l'alimentació de HLD es va administrar durant 5 mesos després de la teràpia.

Tanmateix, la correcció del contingut de metabòlits al fetge, tot i que contribueix a normalitzar els nivells de metabòlits circulants, pot tenir un impacte limitat en la patologia del SNC. En un estudi recent, l'administració d'un vector AAV que expressava GCDH a partir d'un promotor específic del fetge va mostrar un benefici molt moderat, fins i tot quan s'administrava a una dosi molt alta, 15 vegades superior a la utilitzada en l'estudi actual ¹¹⁶. És important, per tant, destacar que en aquest estudi es mostra que mitjançant el lliurament neonatal d'AAV-GCDH és factible aconseguir l'activitat enzimàtica GCDH funcional en estriat i fetge que mantingui el benefici terapèutic.

Un dels factors que contribueix a la patologia de l'acidúria glutàrica a nivell estriatal és l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial ¹⁶². S'ha vist que en aquesta patologia aquest valors solen estar alterats, sobretot en l'exposició a HLD ^{106,108,111} que augmenta el cúmul de GA i 3-OHGA causants de les alteracions en l'estrès oxidatiu ⁹⁰. En tractar els ratolins *Gcdh* ^{-/-} amb el vector AAV-GCDH en una estratègia neonatal s'aconsegueix evitar la inducció en escorça de la peroxidació lipídica degut a la sobrecarrega de lisina. Els nivells de la defensa antioxidant GSH, en canvi, estaven reduïts en els ratolins *Gcdh* ^{-/-} tan tractats com sense tractar.

Possiblement el que succeeix es que la exposició a una dieta alta en lisina provoca de l'estrès oxidatius per radicals lliures d'oxigen que porten al consum de les defenses antioxidants. En el cas dels animals tractats en edat primerenca, l'administració del vector terapèutic i el consum de les defenses antioxidants, GSH, podrien ser suficients per evitar la inducció de la peroxidació lipídica ¹⁰⁶. Mentre que en els animals no tractats, tot i consumir els nivells de GSH, l'increment dels nivells de MDA és inevitable.

Els mecanismes pels quals el GA i el 3-OHGA generen danys a nivell cerebral no s'entenen del tot. Alguns estudis posen l'accent en les alteracions en la neurotransmissió glutamatèrgica i gabaèrgica com a facilitador dels mecanismes d'excitotoxicitat ^{99,104}. Però el que si que se sap es que les principals alteracions associades a la lesió estriatal en pacients amb AG1 són l'astroglíosis reactiva, la pèrdua neuronal i els canvis de la substància blanca ^{176,177}.

En estudis anteriors s'ha determinat que els canvis en la substància blanca estan relacionats amb la formació de vacuoles en el teixit cerebral ^{51,95,112}. Les dades d'aquest estudi també mostren una forta vacuolització, on hi ha una progressió de les lesions per exposició crònica a HLD després de cinc mesos. Cal destacar que es va observar una millora notable de la neuropatologia després d'un mes de teràpia amb el vector AAV-*GCDH* administrat a P1, tot i que els ratolins haguessin estat sota una HLD. També es va observar un rescat parcial del fenotip més greu en els animals tractats que havien estat sota una exposició de 5 mesos a HLD.

L'augment de la immunoreactivitat glial és un segell distintiu del model de ratolí quan s'exposa a la dieta alta en lisina, i s'ha associat a l'augment de les concentracions de GA i 3-OHGA causants d'estrès oxidatiu ⁹⁰. En l'anàlisi de les mostres histopatològiques es va observar un dany estriatal greu amb una forta astrogliosis en els ratolins *Gcdh* ^{-/-} que progressava amb l'edat i en els animals alimentats amb HLD de manera crònica durant 5 mesos. Però aquest fenotip d'astròcits reactius podia ser rescatat per la teràpia amb el vector AAV-*GCDH* en període neonatal.

En investigacions prèvies s'ha determinat que en àrees on hi ha una mielinització reduïda, esdevé una forta vacuolització dins dels paquets axonals ^{51,95,112}. A més a més, també s'ha proposat que alteracions en la mielinització alteren la sinaptogènesi, i que el rescat d'un fenotip d'hipomielinització revertiria els dèficits sinàptics ¹⁷⁸. Els resultats demostren que la desmielinització s'agreuja amb l'edat i l'exposició a la HLD. Però que el tractament amb el vector terapèutic en edat primerenca, rescata el fenotip de pèrdua de mielina. Així que podríem especular que mitjançant la millora de la mielinització amb el tractament AAV-*GCDH* podria haver-hi una recuperació de la funció neuronal.

Tanmateix, l'absència de diferències significatives en l'estudi de la tinció de NeuN en tots els entorns experimentals, descarta la mort neuronal. Informes anteriors també han demostrat l'absència de pèrdua neuronal en els ratolins *Gcdh* ^{-/-}, que es podria atribuir a la baixa vulnerabilitat neuronal d'aquests ratolins als metabòlits neurotòxics ^{51,84,112}.

L'altre hipòtesis del que podria estar succeint es que, primerament, es donaria una disfunció dels astròcits que afectaria al metabolisme neuronal i sinàptic. La incapacitat dels astròcits danyats per experimentar una diferenciació adequada, desencadenarien en la incapacitat de donar suport a les xarxes sinàptiques, la mielinització i la BHE, la qual cosa conduiria a la neurodegeneració. Finalment, la persistència d'aquests astròcits disfuncionals podria impedir els mecanismes de reparació o rehabilitació, i per tant perpetuaria el dany neurològic i provocaria una mort neuronal retardada ¹⁷⁹. En aquest cas podria ser que en l'estudi de la tinció de NeuN, els anàlisis es trobessin en un punt on aquesta mort neuronal encara no ha començat a esdevindre (Figura 58).

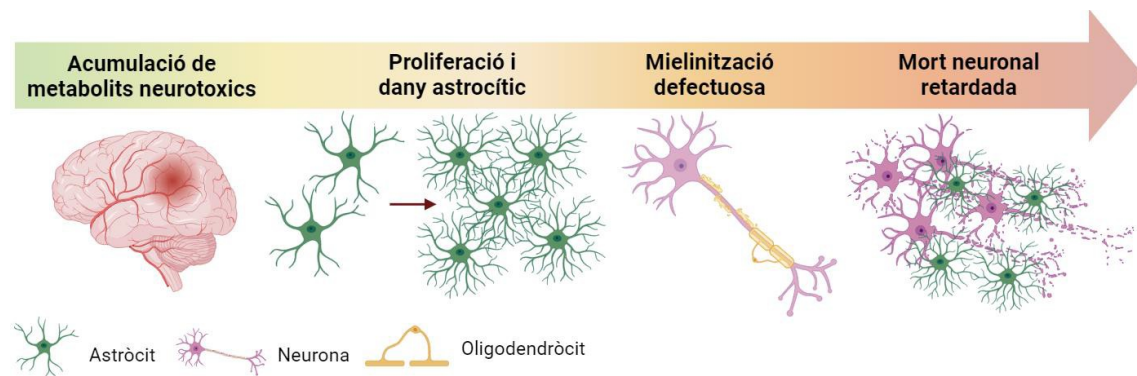


Figura 58. Curs temporal de la hipòtesis dels esdeveniments patològics induïts per l'acumulació dels metabòlits neurotòxics.

Adaptació de Olivera-Bravo 2015.

El NAA és un marcador de la funció i integritat axonal ja que es troba gairebé exclusivament en mitocondris actius de neurones i axons. En pacients amb AG1 s'ha observat una disminució dels nivells de NAA degut a disfunció neuronal ^{180,181}. Els estudis amb el vector AAV-*GCDH* mostren que els ratolins *Gcdh* ^{-/-} amb dieta estàndard tenen un contingut reduït de NAA + NAAG en el nucli estriat. Mentre que si s'exposa aquets ratolins a una HLD, el contingut metabòlic de NAA + NAAG pateix una disminució més dràstica. Aquesta reducció es pot rescatar parcialment en aquells animals que han estat tractats amb la teràpia gènica en etapes neonatals.

En les troballes de la ressonància magnètica van haver-hi dos paràmetres que es van veure alterats en exposar els ratolins *Gcdh* ^{-/-} a una dieta alta en lisina per 5 mesos. Per un costat la difusivitat mitjana, que és una mesura escalar de la difusió total de les molècules en una estructura 3D, i la densitat fibril·lar, que mesura el nombre de fibres en una àrea determinada. Els anàlisi per ressonància magnètica mostren una disminució en la difusivitat mitjana dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} quan aquests estan exposats a una dieta alta en lisina, que es rescatat parcialment en els animals que han estat prèviament tractats amb el vector AAV-*GCDH* en període neonatal. Aquesta disminució en la difusivitat mitjana, en estudis d'imatge de la patologia de la substància blanca del cervell del ratolí, s'ha vist relacionada amb dany axonal ¹⁸².

D'altra banda, la densitat fibril·lar es va veure reduïda, també, en aquells ratolins *Gcdh* ^{-/-} que havien estat exposats durant un llarg període de temps, 5 mesos, a una HLD. Aquesta disminució en el nombre de fibres es va veure especialment reflectit en les fibres que formen part del tracte motor de l'estriat. Possiblement aquest fet podria estar relacionat amb els trastorns del moviment associats a l'AG1 ²⁵. Ja que s'ha vist que el dèficit de connectivitat funcional i les alteracions estructurals degut a la desconexió de les fibres cortico-estriatals, s'han correlacionat àmpliament amb dèficits motors ¹⁸³.

La pèrdua va ser parcialment restaurada en aquells animals que havien sigut tractats amb el vector terapèutic en període neonatal. Aquesta pèrdua axonal podria estar relacionada, també, amb els problemes mielinització que hi ha degut a l'alteració astrocítica ¹⁷⁹. Per tant, aquests resultats donen suport a l'opinió que el lliurament neonatal d'AAV-*GCDH* proporciona neuroprotecció a la lesió estriatal induïda per HLD en ratolins *Gcdh* ^{-/-}.

La supervivència es un dels trets patològics mes notoris a l'hora d'avaluar l'efecte de la dieta en els ratolins *Gcdh* ^{-/-}. En diversos estudis s'ha descrit que en exposar els animals a dietes altes en lisina o proteïnes, compromet la seva supervivència fins al 50% ^{95,96}. En estudis amb un vector AAVPHP-eB han observat que un lliurament intracerebroventricular de *GCDH* millorava la supervivència dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a una dieta alta en proteïna⁸⁴. Els resultats d'aquest estudi mostren que un lliurament menys invasiu, com es l'administració intravenosa, en període neonatal millora el fenotip dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} conduint a la supervivència de tots els ratolins tractats.

5.4 Potencial de translació a pacients amb acidúria glutàrica

Els resultats d'aquest treball posen de manifest el potencial terapèutic considerable del virus terapèutic AAV-*GCDH* que podria oferir-se com una possible teràpia per al tractament de pacients amb AG1. Ja que quan s'administra intravascularment en edats primerenques, un enfocament no invasiu de lliurament, es capaç de demostrar un alta eficàcia en restaurar l'expressió i l'activitat de la proteïna en diferents teixits, de reduir el cúmul de metabòlits, de prevenir la neuropatologia i de restablir completament la supervivència, tot i estar exposat a una dieta alta en lisina. El vector AAV-*GCDH* administrat a pacients pediàtrics, podria protegir del desenvolupament de crisis encefalopàtiques agudes i per tant del dany en el nucli estriat (Figura 59).

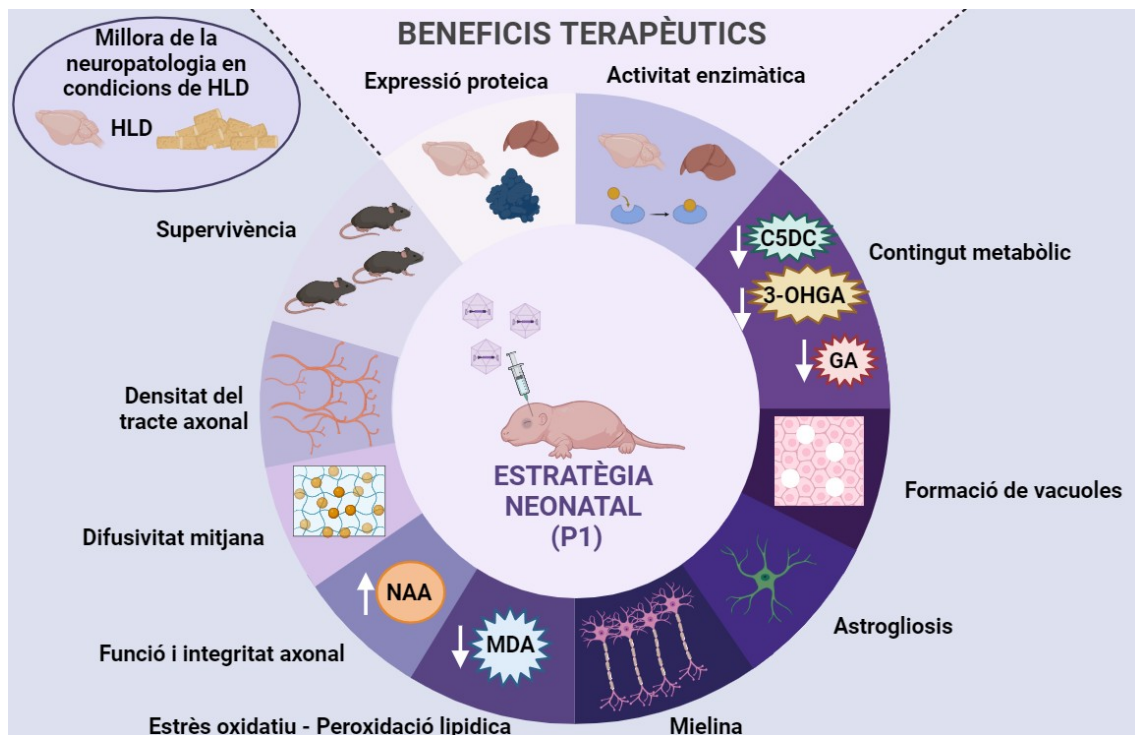


Figura 59. Beneficis terapèutics de la estratègia terapèutica intravenosa en nounats (P1).

Aquesta estratègia seria una bona teràpia a nivell pediàtric ja que la detecció de l'acidúria glutàrica es fa durant el període neonatal dels pacients a través de la prova del teló en el criatge neonatal a tota Espanya i gran part d'Europa ¹⁸⁵. Així que el ràpid diagnòstic podria facilitar als pacients sol·licitar aquest tractament de teràpia gènica en edats primerenques.

A més a més, hi ha un medicament aprovat per la EMA d'una estratègia terapèutica amb AAV9 molt similar a la que es proposa en aquest estudi. Zogelsma es un producte similar al nostre, és AAV9 que conté el gen SMN1 per a l'atrofia muscular espinal que s'administra intravascularment en edats pediàtriques, ja que la gran majoria de pacients la desenvolupen en edat infantil ¹⁵⁴.

És una malaltia neuromotora minoritària greu, ja que té una evolució precoç i molt ràpida, amb una supervivència que, sense tractament, no sol superar els 2 anys en la forma infantil. La gravetat de la malaltia ve determinada per l'afectació motora que condueix a debilitat muscular, el deteriorament de la deglució, la funció pulmonar i bulbar, provocant infeccions i insuficiència respiratòries ¹⁸⁶.

Els pacients tractats, van ser nens de menys de sis mesos d'edat que van rebre la dosi de $1,1 \cdot 10^{14}$ vg/kg ¹⁵⁴. En comparació amb l'estratègia terapèutica proposada en aquest estudi, amb menys dosi, $5 \cdot 10^{13}$ vg/kg, s'observa efecte terapèutic. Per tant, els resultats obtinguts de la proposta de tractament de teràpia gènica amb el vector AAV-GCDH per a l'acidúria glutàrica tipus 1 podrien ser una futura opció terapèutica per a aquest pacient.

D'altra banda, l'estratègia d'administració en adult-jove també podria ser una estratègia terapèutica per l'acidúria glutàrica tipus 1. Ja que per hi ha una restauració en l'expressió proteica i l'activitat enzimàtica de la GCDH en fetge que porta a la reducció del contingut metabòlic en condicions de dieta estàndard (Figura 60). Tal i com s'ha comentat abans, en estudis recents ¹¹⁶, el fet de restaurar l'activitat de la glutaril-CoA deshidrogenasa en fetge pot tenir un benefici moderat en la patologia neuronal però si un benefici a nivell sistèmic.

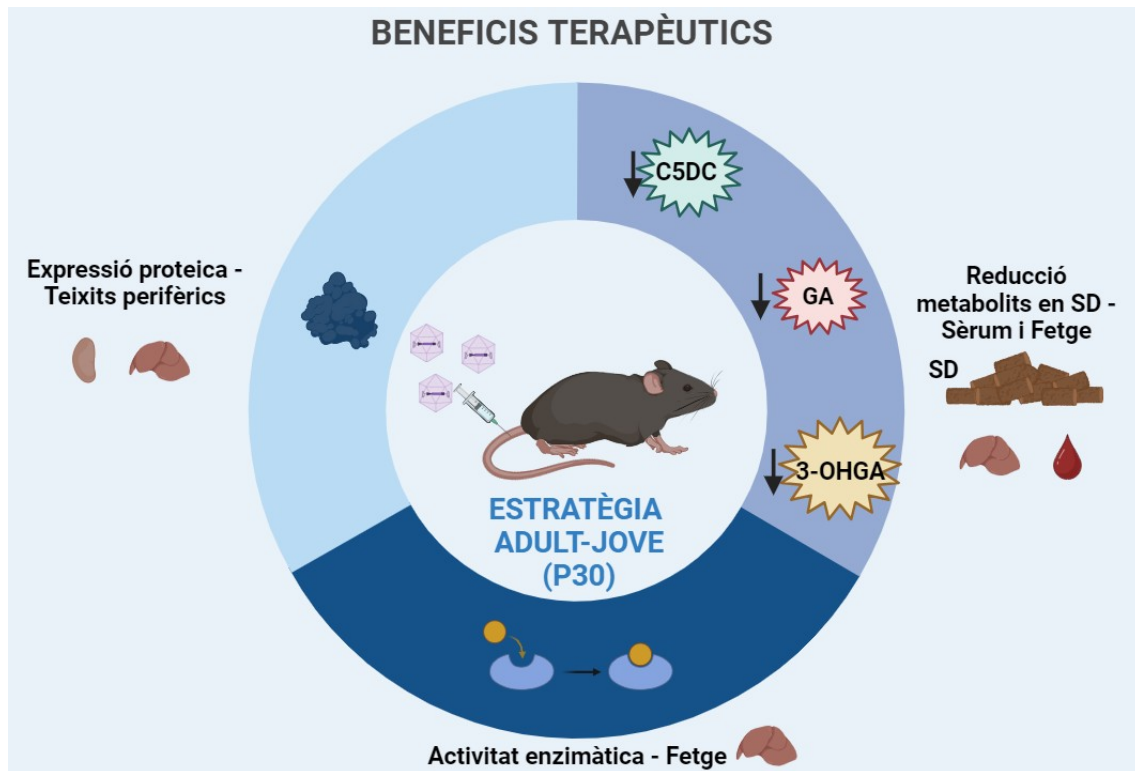


Figura 60. Beneficis terapèutics de la estratègia terapèutica intravenosa en adult-joves (P30).

Degut a que els pacients reben una dieta baixa en lisina ⁵⁵, potser l'administració del vector terapèutic AAV-*GCDH* en edats més avançades del desenvolupament, podria ajudar en la millora de la seva patologia sistèmica. En especial la patologia renal que s'observa en adolescent i adults ¹⁷⁰, que es podria prevenir de forma que s'evitaria el dany renal agut i crònic que pateixen.

En una publicació recent d'un assaig clínic, proposen el benefici terapèutic de la doble estratègia simultània, on divideixen la dosi del vector AAV, entre una administració locoregional, en aquest cas intraventricular, i una administració sistèmica, que s'administren a l'hora. Per tal de poder restaurar l'expressió gènica tan a nivell cerebral com a nivell sistèmic. Tot i que, en aquest cas s'hauria de reavaluar l'efecte del benefici terapèutic del nostre vector en dividir la dosi en els dos sistemes de lliurement ¹⁸⁷.

A tall de conclusió, podríem determinar que l'estratègia d'administració en el període neonatal del vector AAV-*GCDH* podria ser una futura opció terapèutica per l'acidúria glutàrica tipus 1, ja que restauraria molts dels trets neuropatològics de la malaltia, els nivells metabòlics estriatals i la funció proteica tan en teixits neuronals com en fetge.

D'altra banda, l'administració terapèutica del vector en un període del desenvolupament més tardà, podria ser una opció terapèutica per aquells pacients que haguessin passat el període d'administració neonatal, i poguessin tenir una opció terapèutica que restaures la funció proteica a nivell sistèmic.

6. Conclusions

1. El vector AAV-*GCDH* proporciona millor expressió de la proteïna GCDH que el vector AAV-P-*GCDH*, i permet la reducció dels nivells de glutarilcarnitina en fetge, sèrum i cervell després d'una administració intravenosa.
2. L'administració intravenosa del vector AAV-*GCDH* en l'etapa neonatal de P1 és la més eficient per assolir una bona expressió de GCDH en els teixits cerebrals escorça i l'estriat. Mentre que l'administració intravenosa a adult-joves P30 és l'estratègia d'elecció per transduir òrgans perifèrics, com fetge i ronyó.
3. L'expressió i activitat de la GCDH es mantenen en els teixits cerebrals fins almenys 6 mesos després d'una administració intravenosa a P1 i en teixits perifèrics com fetge i ronyó després d'una administració a P30.
4. L'administració intravenosa a P1 del vector AAV-*GCDH* a ratolins *Gcdh* ^{-/-} és capaç de reduir el contingut dels metabòlits C5DC, GA i 3-OHGA en el nucli estriat 1 mes després de la injecció i es manté almenys fins a 6 mesos post-tractament, tot i l'exposició perllongada a una dieta alta en lisina. L'administració intravenosa a P30 és capaç de reduir el contingut de metabòlits a fetge i sèrum en condicions de dieta estàndard a 1 i 6 mesos post-tractament, però no corregeix els nivells de metabòlits en el nucli estriat.
5. L'exposició a una dieta alta en lisina provoca un trencament de l'homeòstasi del sistema redox en ratolins *Gcdh* ^{-/-} que pot ser parcialment restablert després d'una administració intravenosa del vector AAV-*GCDH*.
6. L'administració intravenosa a P1 del vector AAV-*GCDH* en ratolins *Gcdh* ^{-/-} exposats a una dieta alta en lisina, protegeix, al menys parcialment, de les principals alteracions neuropatològiques tal i com suggereixen les anàlisi d'imatge per RMN i la mínima vacuolació, la reduïda inducció d'astrogliosis o el manteniment de la capa de mielina axonal en el nucli estriat.
7. L'exposició dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} a una dieta alta en lisina indueix un fenotip sever que dóna lloc a una supervivència del 40% dels ratolins als 6 mesos. L'administració intravenosa del AAV-*GCDH* en l'etapa neonatal de P1 permet un 100% de supervivència dels ratolins *Gcdh* ^{-/-} sotmesos a la dieta.
8. La teràpia gènica basada amb l'administració sistèmica del vector AAV-*GCDH* en etapes primerenques representa una estratègia amb potencial terapèutic per a l'acidúria glutàrica tipus 1.

7. Bibliografia

1. Klimova, B., Storek, M., Valis, M. & Kuca, K. Global View on Rare Diseases: A Mini Review. *Curr. Med. Chem.* **24**, 3153–3158 (2017).
2. Ferreira, C. R. The burden of rare diseases. *Am. J. Med. Genet. Part A* **179**, 885–892 (2019).
3. Richter, T. *et al.* Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Heal.* **18**, 906–914 (2015).
4. Elliott, E. J. & Zurynski, Y. A. Rare diseases are a ‘common’ problem for clinicians. *Aust. Fam. Physician* **44**, 630–633 (2015).
5. Marešová, P., Mohelská, H. & Kuča, K. Cooperation Policy of Rare Diseases in the European Union. *Procedia - Soc. Behav. Sci.* **171**, 1302–1308 (2015).
6. Pogue, R. E. *et al.* Rare genetic diseases : update on diagnosis , treatment and online resources. *Drug Discov. Today* **23**, 187–195 (2017).
7. Choi, M. *et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19096–19101 (2009).
8. Polla, D. L. *et al.* Use of Targeted Exome Sequencing for Molecular Diagnosis of Skeletal Disorders. *PLoS One* **10**, e0138314 (2015).
9. Rabbani, B., Tekin, M. & Mahdieh, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J. Hum. Genet.* **59**, 5–15 (2014).
10. Fishman, J. C. & Skrepnek, G. H. Pharmacoeconomic analyses of treatments for rare disease. *Pharm. Policy Law* **14**, 51–67 (2012).
11. Groot, S. C., Posada, M. & Taruscio, D. Progress, challenges and global approaches to rare diseases. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **110**, 2711–2716 (2021).
12. Ferreira, C. R. & van Karnebeek, C. D. M. *Inborn errors of metabolism. Handbook of Clinical Neurology* **162**, (Elsevier B.V., 2019).
13. Garrod, A. E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902 [classical article]. *Yale J. Biol. Med.* **75**, 221–231 (2002).

14. Illsinger, S. & Das, A. M. Critical Review Impact of Selected Inborn Errors of Metabolism on Prenatal and Neonatal Development. **62**, 403–413 (2010).
15. Lanpher, B., Brunetti-pierri, N. & Lee, B. Inborn errors of metabolism : the flux from Mendelian to complex diseases. **7**, 449–460 (2006).
16. Karnebeek, C. D. M. Van & Stockler, S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability : A systematic literature review. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 368–381 (2012).
17. Baumgartner, M. R. *et al.* Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. 1–36 (2014).
18. Goodman, S. I., Markey, S. P., Moe, P. G., Miles, B. S. & Teng, C. C. Glutaric aciduria; a 'new' disorder of amino acid metabolism. *Biochem. Med.* **12**, 12–21 (1975).
19. Hedlund, G. L., Longo, N. & Pasquali, M. Glutaric Acidemia Type 1. **94**, 86–94 (2006).
20. Basinger, A. A. *et al.* Glutaric acidemia type 1 in patients of Lumbee heritage from North Carolina. **88**, 90–92 (2006).
21. Morton, D. H., Bennett, M. J., Seargeant, L. E., Nichter, C. A. & Kelley, R. I. Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am. J. Med. Genet.* **41**, 89–95 (1991).
22. Naughten, E. R. *et al.* Glutaric aciduria type I: outcome in the Republic of Ireland. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 917–920 (2004).
23. van der Watt, G. *et al.* Glutaric aciduria type 1 in South Africa-high incidence of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in black South Africans. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 178–182 (2010).
24. Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Robinson, D. L. & Morton, D. H. Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **121C**, 38–52 (2003).
25. Schuurmans, I. M. E. *et al.* Exploring genotype–phenotype correlations in glutaric aciduria type 1. *J. Inherit. Metab. Dis.* **46**, 371–390 (2023).
26. Begley, D. W. *et al.* Probing conformational states of glutaryl-CoA dehydrogenase by fragment screening. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 1060–1069 (2011).

27. Bross, P. *et al.* Heterozygosity for an in-frame deletion causes glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient detected by newborn screening: investigation of the effect of the mutant allele. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 787–796 (2012).
28. Mosaeilhy, A. *et al.* Genotype-phenotype correlation in 18 Egyptian patients with glutaric acidemia type I. *Metab. Brain Dis.* **32**, 1417–1426 (2017).
29. Schmiesing, J. *et al.* Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation and mitochondria architecture. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 538–551 (2017).
30. Biery, B. J., Stein, D. E., Morton, D. H. & Goodman, S. I. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 1006–1011 (1996).
31. Greenberg, C. R. *et al.* A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 493–495 (1995).
32. Greenberg, C. R. *et al.* Outcome of the first 3-years of a DNA-based neonatal screening program for glutaric acidemia type 1 in Manitoba and northwestern Ontario, Canada. *Mol. Genet. Metab.* **75**, 70–78 (2002).
33. Baric, I. *et al.* Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**, 867–881 (1999).
34. Goodman, S. I. *et al.* Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum. Mutat.* **12**, 141–144 (1998).
35. Busquets, C. *et al.* *Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Spain: Evidence of Two Groups of Patients, Genetically, and Biochemically Distinct.* (2000).
36. Christensen, E., Ribes, A., Merinero, B. & Zschocke, J. Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 861–868 (2004).
37. Kölker, S. *et al.* Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **59**, 840–847 (2006).

38. Boy, N. *et al.* Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision. *J. Inherit. Metab. Dis.* **40**, 75–101 (2017).
39. Christensen, E. *et al.* Compound heterozygosity in the glutaryl-CoA dehydrogenase gene with R227P mutation in one allele is associated with no or very low free glutarate excretion. *J. Inherit. Metab. Dis.* **20**, 383–386 (1997).
40. Schillaci, L.-A. P. *et al.* The M405V allele of the glutaryl-CoA dehydrogenase gene is an important marker for glutaric aciduria type I (GA-I) low excretors. *Mol. Genet. Metab.* **119**, 50–56 (2016).
41. Baradaran, M. *et al.* Molecular determination of glutaric aciduria type I in individuals from southwest Iran. *Arch. Iran. Med.* **17**, 629–632 (2014).
42. Schwartz, M., Christensen, E., Superti-Furga, A. & Brandt, N. J. The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: Report of intronic sequences and of 13 novel mutations causing glutaric aciduria type I. *Hum. Genet.* **102**, 452–458 (1998).
43. Gupta, N. *et al.* Glutaric Acidemia Type 1-Clinico-Molecular Profile and Novel Mutations in GCDH Gene in Indian Patients. *JIMD Rep.* **21**, 45–55 (2015).
44. Tp, K.-V., Muntaj, S., Devaraju, K. S., Kamate, M. & Vedamurthy, A. B. Genetic Screening of Selected Disease-Causing Mutations in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Gene among Indian Patients with Glutaric Aciduria Type I. *J. Pediatr. Genet.* **6**, 142–148 (2017).
45. Goodman, S. I. *et al.* Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1493–1498 (1995).
46. Fu, Z. *et al.* Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry* **43**, 9674–9684 (2004).
47. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
48. Zinnanti, W. J. *et al.* Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J. Clin. Invest.* **117**, 3258–3270 (2007).

49. Biagosch, C. *et al.* Elevated glutaric acid levels in Dhtkd1-/Gcdh- double knockout mice challenge our current understanding of lysine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 2220–2228 (2017).
50. Hernández-Palazón, J., Sánchez-Ródenas, L., Martínez-Lage, J. F. & Collado, I. C. Anesthetic management in two siblings with glutaric aciduria type 1. *Paediatr. Anaesth.* **16**, 188–191 (2006).
51. Koeller, D. M. *et al.* Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type 1. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 347–357 (2002).
52. Thies, B. *et al.* Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 1463–1472 (2013).
53. Strauss, K. A. *et al.* Safety, efficacy and physiological actions of a lysine-free, arginine-rich formula to treat glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: Focus on cerebral amino acid influx. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 93–106 (2011).
54. Sauer, S. W. *et al.* Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* **97**, 899–910 (2006).
55. Austin Larson, M. & Steve Goodman, MD, F. Glutaric Acidemia Type 1 Summary Genetic counseling. *GeneReviews® [Internet]* 1–27 (2019).
56. Lehnert, W. & Sass, J. O. Glutaconyl-CoA is the main toxic agent in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *Med. Hypotheses* **65**, 330–333 (2005).
57. López-Laso, E. *et al.* Classic and late-onset neurological disease in two siblings with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 979 (2007).
58. Wang, Q. *et al.* Clinical and mutational spectra of 23 Chinese patients with glutaric aciduria type 1. *Brain Dev.* **36**, 813–822 (2014).
59. Boy, N. *et al.* Patterns, evolution, and severity of striatal injury in insidious- vs acute-onset glutaric aciduria type 1. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 117–127 (2019).

60. Foran, J., Moore, M., Crushell, E., Knerr, I. & McSweeney, N. Low excretor glutaric aciduria type 1 of insidious onset with dystonia and atypical clinical features, a diagnostic dilemma. *JIMD Rep.* **58**, 12–20 (2021).
61. Kölker, S. *et al.* The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 1041–1057 (2015).
62. Kölker, S. *et al.* The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 1059–1074 (2015).
63. Kyllerman, M. *et al.* Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **8**, 121–129 (2004).
64. Zinnanti, W. J. Mouse model of encephalopathy and novel treatment strategies with substrate competition in glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**, 899–910 (2019).
65. Kölker, S. *et al.* Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I - A decade of experience. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 72–80 (2012).
66. Heringer, J. *et al.* Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I. *Ann. Neurol.* **68**, 743–752 (2010).
67. Boy, N. *et al.* Low lysine diet in glutaric aciduria type I--effect on anthropometric and biochemical follow-up parameters. *J. Inherit. Metab. Dis.* **36**, 525–533 (2013).
68. Hopstia Sant Joan de Déu Barcelona. Aciduria glutárica tipo 1. (2022). Available at: <https://metabolicas.sjdhospitalbarcelona.org/ecm/aciduria-glutarica-tipo-1>. (Accessed: 29th September 2023)
69. Kölker, S. *et al.* Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 5–22 (2007).
70. Boy, N. *et al.* Impact of newborn screening and quality of therapy on the neurological outcome in glutaric aciduria type 1: a meta-analysis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **23**, 13–21 (2021).
71. Jafari, P., Braissant, O., Bonafé, L. & Ballhausen, D. The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 425–437 (2011).

72. European Medicines Agency. Clinical trials in human medicines. (2023). Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/clinical-trials-human-medicines>. (Accessed: 29th September 2023)
73. U.S. government. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>. (Accessed: 29th September 2023)
74. Yuan, Y. *et al.* Phenotypic prediction in glutaric aciduria type 1 combining in silico and in vitro modeling with real-world data. *J. Inherit. Metab. Dis.* **46**, 391–405 (2023).
75. Shadmehri, A. A. *et al.* Molecular genetic study of glutaric aciduria, type I: Identification of a novel mutation. *J. Cell. Biochem.* **120**, 3367–3372 (2019).
76. Guerreiro, G. *et al.* Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of l-carnitine treatment. *J. Cell. Biochem.* **119**, 10021–10032 (2018).
77. Mateu-Bosch A, Segur-Bailach E, García-Villoria J, Gea-Sorlí S, Ruiz I, del Rey J, Camps, J, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Tort F, Ribes A, F. C. Modeling Glutaric Aciduria Type I in human neuroblastoma cells recapitulates neuronal damage that can be rescued by gene replacement.
78. Keyser, B. *et al.* Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3854–3863 (2008).
79. Leandro, J. *et al.* DHTKD1 and OGDH display substrate overlap in cultured cells and form a hybrid 2-oxo acid dehydrogenase complex in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **29**, 1168–1179 (2020).
80. Leandro, J. *et al.* Deletion of 2-aminoadipic semialdehyde synthase limits metabolite accumulation in cell and mouse models for glutaric aciduria type 1. *J. Inherit. Metab. Dis.* **43**, 1154–1164 (2020).
81. Schmiesing, J., Schlüter, H., Ullrich, K., Bräulke, T. & Mühlhausen, C. Interaction of glutaric aciduria type 1-related glutaryl-CoA dehydrogenase with mitochondrial matrix proteins. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
82. Schuurmans, I. M. E., Wu, K. M., van Karnebeek, C. D. M., Nadif Kasri, N. & Garanto, A. Generation of an induced pluripotent stem cell line carrying a biallelic deletion (SCTCi019-A) in GCDH using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res.* 103069 (2023). doi:10.1016/j.scr.2023.103069

83. Tian, F. *et al.* Glutaric acid-mediated apoptosis in primary striatal neurons. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
84. Freudenberg, F., Lukacs, Z. & Ullrich, K. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol. Dis.* **16**, 581–584 (2004).
85. Kölker, S. *et al.* Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* **52**, 199–206 (2002).
86. Gao, J. *et al.* Effects of Targeted Suppression of Glutaryl-CoA Dehydrogenase by Lentivirus-Mediated shRNA and Excessive Intake of Lysine on Apoptosis in Rat Striatal Neurons. *PLoS One* **8**, (2013).
87. Fu, X. *et al.* Mechanistic effects of amino acids and glucose in a novel glutaric aciduria type 1 cell model. *PLoS One* **9**, e110181 (2014).
88. Rodrigues, M. D. N. *et al.* Higher Vulnerability of Menadione-Exposed Cortical Astrocytes of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice to Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Death: Implications for the Neurodegeneration in Glutaric Aciduria Type I. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4795–4805 (2017).
89. Komatsuzaki, S., Ediga, R. D., Okun, J. G., Kölker, S. & Sauer, S. W. Impairment of astrocytic glutaminolysis in glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 91–99 (2018).
90. Olivera-Bravo, S. *et al.* Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh^{-/-} mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4504–4515 (2015).
91. Lamp, J. *et al.* Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 17777–17784 (2011).
92. Cudré-Cung, H. P. *et al.* Ammonium accumulation and chemokine decrease in culture media of Gcdh^{-/-} 3D reaggregated brain cell cultures. *Mol. Genet. Metab.* 0–1 (2019). doi:10.1016/j.ymgme.2019.01.009
93. Jafari, P. *et al.* Ammonium Accumulation and Cell Death in a Rat 3D Brain Cell Model of Glutaric Aciduria Type I. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).

94. Schmiesing, J. *et al.* Disease-Linked Glutarylation Impairs Function and Interactions of Mitochondrial Proteins and Contributes to Mitochondrial Heterogeneity. *Cell Rep.* **24**, 2946–2956 (2018).
95. Zinnanti, W. J. *et al.* A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* **129**, 899–910 (2006).
96. Zinnanti, W. J. & Lazovic, J. Mouse model of encephalopathy and novel treatment strategies with substrate competition in glutaric aciduria type I. *Mol. Genet. Metab.* **100**, S88–S91 (2010).
97. Thies, B. *et al.* Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 1463–1472 (2013).
98. Keyser, B. *et al.* Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1782**, 385–390 (2008).
99. Busanello, E. N. B. *et al.* Neurodevelopmental and cognitive behavior of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient knockout mice. *Life Sci.* **92**, 137–142 (2013).
100. Amaral, A. U. *et al.* Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 375–382 (2012).
101. Sauer, S. W. *et al.* Therapeutic modulation of cerebral l-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* **134**, 157–170 (2011).
102. Posset, R. *et al.* Understanding cerebral L-lysine metabolism: the role of L-pipecolate metabolism in Gcdh-deficient mice as a model for glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 265–272 (2015).
103. Bjugstad, K. B., Crnic, L. S., Goodman, S. I. & Freed, C. R. Infant mice with glutaric acidaemia type I have increased vulnerability to 3-nitropropionic acid toxicity. *J. Inherit. Metab. Dis.* **29**, 612–619 (2006).
104. Rodrigues, M. D. N. *et al.* Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA i neuropathology. *J. Neurol. Sci.* **359**, 133–140 (2015).

105. Amaral, A. U. *et al.* Acute lysine overload provokes marked striatum injury involving oxidative stress signaling pathways in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice. *Neurochem. Int.* **129**, 104467 (2019).
106. Seminotti, B. *et al.* Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* **108**, 30–39 (2013).
107. Seminotti, B. *et al.* Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol. Genet. Metab.* **106**, 31–38 (2012).
108. Seminotti, B. *et al.* Oxidative Stress, Disrupted Energy Metabolism, and Altered Signaling Pathways in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Knockout Mice: Potential Implications of Quinolinic Acid Toxicity in the Neuropathology of Glutaric Acidemia Type I. *Mol. Neurobiol.* **53**, 6459–6475 (2016).
109. Seminotti, B. *et al.* Lipopolysaccharide-Elicited Systemic Inflammation Induces Selective Vulnerability of Cerebral Cortex and Striatum of Developing Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh $-/-$) Mice to Oxidative Stress. *Neurotox. Res.* **38**, 1024–1036 (2020).
110. Seminotti, B., Brondani, M., Ribeiro, R. T., Leipnitz, G. & Wajner, M. Disturbance of Mitochondrial Dynamics, Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Crosstalk, Redox Homeostasis, and Inflammatory Response in the Brain of Glutaryl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice: Neuroprotective Effects of Bezafibrate. *Mol. Neurobiol.* **59**, 4839–4853 (2022).
111. Guerreiro, G. *et al.* L-Carnitine prevents oxidative stress in striatum of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1865**, 2420–2427 (2019).
112. Olivera-Bravo, S. *et al.* Long Lasting High Lysine Diet Aggravates White Matter Injury in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh $-/-$) Mice. *Mol. Neurobiol.* **56**, 648–657 (2019).
113. Sauer, S. W. *et al.* Multifactorial modulation of susceptibility to l-lysine in an animal model of glutaric aciduria type I. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 768–777 (2015).

114. Vendramin Pasquetti, M. *et al.* Impairment of GABAergic system contributes to epileptogenesis in glutaric acidemia type I. *Epilepsia* **58**, 1771–1781 (2017).
115. Naylor, M. C. *et al.* Heparan sulfate mediates neuroprotection from degeneration in experimental glutaric aciduria. *Cell Transplant.* **16**, 187–195 (2007).
116. Barzi, M. *et al.* Rescue of glutaric aciduria type I in mice by liver-directed therapies. *Sci. Transl. Med.* **15**, (2023).
117. Mühlhausen, C. *et al.* Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 829–834 (2004).
118. Latini, A. *et al.* Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **27**, 423–438 (2007).
119. Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C. S. & Wajner, M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**, 57–67 (2005).
120. Rodrigues, F. S. *et al.* N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups. *PLoS One* **8**, 1–18 (2013).
121. Braissant, O. *et al.* Immunolocalization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) in adult and embryonic rat brain and peripheral tissues. *Neuroscience* **343**, 355–363 (2017).
122. Gonzalez Melo, M. *et al.* The first knock-in rat model for glutaric aciduria type I allows further insights into pathophysiology in brain and periphery. *Mol. Genet. Metab.* **133**, 157–181 (2021).
123. Gonzalez Melo, M. *et al.* A knock-in rat model unravels acute and chronic renal toxicity in glutaric aciduria type I. *Mol. Genet. Metab.* **134**, 287–300 (2021).
124. Wolff, J. A. & Lederberg, J. An Early History of Gene Transfer and Therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**, 469–480 (1994).
125. Arabi, F., Mansouri, V. & Ahmadbeigi, N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomed. Pharmacother.* **153**, 113324 (2022).
126. Sayed, N. *et al.* Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci.* **294**, 120375 (2022).

127. Rosenberg, S. A. *et al.* Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990).
128. Blaese, R. M. *et al.* T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA– SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science (80-.)*. **270**, 475–480 (1995).
129. Dunbar, C. E. *et al.* Gene therapy comes of age. *Science (80-.)*. **359**, (2018).
130. Newby, G. A. & Liu, D. R. In vivo somatic cell base editing and prime editing. *Mol. Ther.* **29**, 3107–3124 (2021).
131. van der Oost, J. & Patinios, C. The genome editing revolution. *Trends Biotechnol.* **41**, 396–409 (2023).
132. Doudna, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* **578**, 229–236 (2020).
133. Alnasser, S. M. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene* **769**, 145246 (2021).
134. Kaufmann, K. B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A. & Grez, M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1642–1661 (2013).
135. Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V. & Rizvanov, A. A. Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells* **12**, 1–41 (2023).
136. Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science (80-.)*. **149**, 754–756 (1965).
137. Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. & Rowe, W. P. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**, 1467–1474 (1966).
138. Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Bürkle, A., Schlehofer, J. R. & zur Hausen, H. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* **48**, 3123–3129 (1988).
139. Berns, K. I. Biology of Adeno-associated Virus. 1–2 (1996).
140. Pupo, A. *et al.* AAV vectors: The Rubik’s cube of human gene therapy. *Mol. Ther.* **30**, 3515–3541 (2022).

141. Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
142. Wang, D., Tai, P. W. L. & Gao, G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 358–378 (2019).
143. Gonçalves, M. A. F. V. Adeno-associated virus: From defective virus to effective vector. *Viol. J.* **2**, 1–17 (2005).
144. Huang, L.-Y. *et al.* Characterization of the Adeno-Associated Virus 1 and 6 Sialic Acid Binding Site. *J. Virol.* **90**, 5219–5230 (2016).
145. Gao, G. P. *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11854–11859 (2002).
146. Lisowski, L., Tay, S. S. & Alexander, I. E. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **24**, 59–67 (2015).
147. Ling, C. *et al.* Strategies to generate high-titer, high-potency recombinant AAV3 serotype vectors. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **3**, 16029 (2016).
148. Padron, E. *et al.* Structure of Adeno-Associated Virus Type 4. *J. Virol.* **79**, 5047–5058 (2005).
149. Le Meur, G. *et al.* Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis. *Mol. Ther.* **26**, 256–268 (2018).
150. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* **199**, 381–390 (2009).
151. Hermonat, P. L., Quirk, J. G., Bishop, B. M. & Han, L. The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Lett.* **407**, 78–84 (1997).
152. Lek, A. *et al.* Unexpected Death of a Duchenne Muscular Dystrophy Patient in an N-of-1 Trial of rAAV9-delivered CRISPR-transactivator. *medRxiv* 2023.05.16.23289881 (2023).
153. Mendell, J. R. *et al.* Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol. Ther.* **29**, 464–488 (2021).

154. European Medicines Agency. European Medicines Agency - Medicines. (2023). Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>. (Accessed: 29th September 2023)
155. Foust, K. D. *et al.* Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* **27**, 59–65 (2009).
156. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080 (2008).
157. Xu, L. *et al.* CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum. Gene Ther.* **12**, 563–573 (2001).
158. Earley, L. F. *et al.* Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Inverted Terminal Repeat Sequence Role in Vector Transgene Expression. *Hum. Gene Ther.* **31**, 151–162 (2020).
159. Nieuwenhuis, B. *et al.* Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Ther.* **28**, 56–74 (2021).
160. Garbade, S. F. *et al.* Unravelling the complex MRI pattern in glutaric aciduria type I using statistical models—a cohort study in 180 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* **37**, 763–773 (2014).
161. Lowenstein, P. R. news and views Crossing the Rubicon. *Neurotherapeutics* **27**, 42–44 (2009).
162. Wajner, M., Amaral, A. U., Leipnitz, G. & Seminotti, B. Pathogenesis of brain damage in glutaric acidemia type I: Lessons from the genetic mice model. *Int. J. Dev. Neurosci.* 0–1 (2019). doi:10.1016/j.ijdevneu.2019.05.005
163. Campistol, J., Ribes, A., Alvarez, L., Christensen, E. & Millington, D. S. Glutaric aciduria type I: Unusual biochemical presentation. *J. Pediatr.* **121**, 83–86 (1992).
164. Pineda, M. *et al.* Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Dev. Med. Child Neurol.* **40**, 840–842 (1998).
165. Nunes, J. *et al.* Brain MRI findings as an important diagnostic clue in glutaric aciduria type 1. *Neuroradiol. J.* **26**, 155–161 (2013).

166. Kuzmin, D. A. *et al.* The clinical landscape for AAV gene therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 173–174 (2021).
167. Powell, S. K., Rivera-Soto, R. & Gray, S. J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* **19**, 49–57 (2015).
168. Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. & Hope, T. J. WPRE_Zufferey.pdf. **73**, 2886–2892 (1999).
169. The Human Protein Atlas - GCDH. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105607-GCDH/tissue>. (Accessed: 29th September 2023)
170. Boy, N. *et al.* Recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type 1: third revision. *J. Inherit. Metab. Dis.* (2022). doi:10.1002/jimd.12566
171. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317–334 (2017).
172. Au, H. K. E., Isalan, M. & Mielcarek, M. Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Front. Med.* **8**, 1–14 (2022).
173. Davis, L. & Park, F. Gene therapy research for kidney diseases. *Physiol. Genomics* **51**, 449–461 (2019).
174. Byrne, B. J., Corti, M. & Muntoni, F. Considerations for Systemic Use of Gene Therapy. *Mol. Ther.* **29**, 422–423 (2021).
175. Fischell, J. M. & Fishman, P. S. A Multifaceted Approach to Optimizing AAV Delivery to the Brain for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **15**, 1–20 (2021).
176. Funk, C. B. R. *et al.* Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* **128**, 711–722 (2005).
177. Soffer, D. *et al.* Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric acidemia. *J. Neurol. Sci.* **107**, 199–204 (1992).
178. Wang, F. *et al.* Enhancing Oligodendrocyte Myelination Rescues Synaptic Loss and Improves Functional Recovery after Chronic Hypoxia. *Neuron* **99**, 689–701.e5 (2018).

179. Olivera-Bravo, S. & Barbeito, L. A role of astrocytes in mediating postnatal neurodegeneration in Glutaric acidemia-type 1. *FEBS Lett.* **589**, 3492–3497 (2015).
180. Kurul, S., Çakmakçı, H. & Dırık, E. Glutaric aciduria type 1: Proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Pediatr. Neurol.* **31**, 228–231 (2004).
181. Pérez-Dueñas, B. *et al.* Brain injury in glutaric aciduria type I: The value of functional techniques in magnetic resonance imaging. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **13**, 534–540 (2009).
182. Zhang, J. Diffusion tensor imaging of white matter pathology in the mouse brain. *Imaging Med.* **2**, 623–632 (2010).
183. Conde-Berriozabal, S. *et al.* M2 Cortex Circuitry and Sensory-Induced Behavioral Alterations in Huntington's Disease: Role of Superior Colliculus. *J. Neurosci.* **43**, 3379–3390 (2023).
184. Guo, L. *et al.* Treatment of glutaric aciduria type I (GA-I) via intracerebroventricular delivery of GCDH. *Fundam. Res.* **2**, 836–842 (2022).
185. Loeber, J. G., Platis, D., Zetterström, R. H. & Schielen, P. J. C. I. Neonatal screening in Europe revisited: An ISNS-perspective on the current state and developments since 2010. *Medecine/Sciences* **37**, 441–456 (2021).
186. Mercuri, E., Sumner, C. J., Muntoni, F., Darras, B. T. & Finkel, R. S. Spinal muscular atrophy. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **8**, (2022).
187. Corti, M. *et al.* Adeno-associated virus-mediated gene therapy in a patient with Canavan disease using dual routes of administration and immune modulation. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **30**, 303–314 (2023).