

# Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica

Mayra Mena-Enriquez,\* Lucia Flores-Contreras,\* Juan Armendáriz-Borunda\*

\* Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica,  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

**Adeno-associated viral  
vectors: methods for production and  
purification for gene therapy applications**

## ABSTRACT

*Viral vectors based on adeno-associated virus (AAV) are widely used in gene therapy protocols, because they have characteristics that make them valuable for the treatment of genetic and chronic degenerative diseases. AAV2 serotype had been the best characterized to date. However, the AAV vectors developed from other serotypes is of special interest, since they have organ-specific tropism which increases their potential for transgene delivery to target cells for performing their therapeutic effects. This article summarizes AAV generalities, methods for their production and purification. It also discusses the use of these vectors in vitro, in vivo and their application in gene therapy clinical trials.*

**Key words.** Viral vectors. Adeno-associated virus. AAV recombinant. AAV purification. Gene therapy.

## INTRODUCCIÓN

Los virus adeno-asociados (VAA) son vectores prometedores en el ámbito de la terapia génica debido a que no se han asociado con ninguna enfermedad, además de la baja respuesta inmune que generan en el humano. Para la generación de los virus adeno-asociados recombinantes (rVAA) todos sus genes son eliminados, lo que aumenta su seguridad en aplicaciones clínicas y, además de ésta, los rVAA transducen células que se encuentran tanto en división como en reposo. Infechan varios tipos celulares, incluyendo sistema nervioso, hígado, músculo esquelético, riñón, pulmón y ojo; pueden mediar la expresión génica de un determinado transgen hasta

## RESUMEN

Los vectores virales basados en virus adeno-asociados (VAA) son ampliamente utilizados en protocolos de terapia génica, esto se debe a que poseen características que los convierten en valiosas herramientas para el tratamiento de enfermedades genéticas, así como de otras patologías crónico-degenerativas. El serotipo VAA2 ha sido el mejor caracterizado hasta el momento; sin embargo, el desarrollo de vectores VAA derivados de otros serotipos ha tenido especial atención debido a que presentan diferente tropismo y eso aumenta su potencial para el envío del transgen a otras células blanco, lo que los hace útiles en la terapéutica de otras enfermedades específicas. Este artículo aborda las características generales de los VAA, los métodos de producción y purificación. Además, se analiza la aplicación de estos vectores en modelos *in vitro* e *in vivo*, así como en protocolos clínicos de terapia génica.

**Palabras clave.** Vectores virales. Virus adeno-asociados. VAA recombinantes. Purificación de VAA. Terapia génica.

por 12 meses, e inducen una limitada respuesta inmune humoral y celular por su incapacidad de transducir células dendríticas.<sup>1-4</sup> De los 12 serotipos de VAA descubiertos hasta el momento, el serotipo 2 ha sido el mejor caracterizado y el más utilizado como vector recombinante, sobre todo en protocolos clínicos de terapia génica.<sup>5,6</sup> Debido al gran potencial que representan los VAA se han desarrollado nuevos sistemas de producción para incrementar el título de las partículas virales producidas con la pureza y calidad requeridos para su empleo *in vivo*. Esta revisión pretende abordar las características generales de los VAA, los sistemas de producción y purificación de los rVAA y su aplicación en protocolos experimentales y clínicos de terapia génica.

## Virus adeno-asociados

Los VAA fueron descubiertos como contaminantes en preparaciones de adenovirus en 1965. Pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*; éstos requieren de un virus colaborador como un adenovirus (Ad) o un virus del herpes simple que les proporcione las proteínas necesarias para replicarse eficientemente. En ausencia de un virus colaborador los VAA permanecen de forma latente en la célula.<sup>7</sup>

### Estructura de los VAA silvestres y recombinantes

Los VAA son virus pequeños de ADN de cadena sencilla de 4.7 Kb y su genoma contiene dos genes: *rep* (replicación) y *cap* (cápside). El gen *rep* codifica para cuatro proteínas reguladoras Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Las proteínas Rep78 y Rep68 participan en la replicación, integración y en la formación de genomas virales de cadena sencilla.<sup>8</sup> El gen *cap* codifica para tres proteínas estructurales VP1 (87 kDa), VP2 (73 kDa) y VP3 (62 kDa). Estas tres proteínas son necesarias para la generación de las partículas infecciosas.<sup>9</sup>

El genoma de los VAA está flanqueado por dos secuencias terminales llamadas ITRs (*Inverted Terminal Repeats*) de 145 nucleótidos que forman una estructura característica de horquilla en forma de T debido a su naturaleza palindrómica. Los ITRs son los únicos elementos *cis* que se requieren para la

replicación y empaquetamiento viral. En los rVAA los genes *rep* y *cap* son sustituidos por el promotor y transgen deseado (Figura 1). El virión del VAA no contiene proteínas de envoltura y su ADN se encuentra rodeado por las proteínas de la cápside, las cuales conforman una estructura icosaédrica de 18-25 nm de diámetro.<sup>10</sup> Las diferencias antigénicas en estas proteínas de la cápside dan lugar a los 12 serotipos de VAA conocidos hasta el momento. En la actualidad se emplean pseudotipos de VAA, rVAA formados por los ITRs y las proteínas Rep de un serotipo y las proteínas de la cápside de otro serotipo (VAA2/1).<sup>11</sup>

### Ciclo viral del VAA silvestre

La infección de los VAA inicia con el anclaje de la cápside viral a la superficie celular a través de un receptor y co-receptores. Se ha descrito que el sulfato de heparán es el receptor para el VAA2; las integrinas  $\alpha V\beta 5$  y el receptor del factor crecimiento de fibroblastos funcionan como co-receptores.<sup>12-14</sup> La interacción entre los VAA y las integrinas  $\alpha V\beta 5$  resulta en la endocitosis de las partículas virales dentro de la célula, la acidificación del endosoma tardío permite a las partículas virales escapar y penetrar en el citosol, el genoma viral entra al núcleo donde puede seguir dos vías diferentes; el ciclo lítico o el lisogénico. Cuando los VAA silvestres infectan las células, el ADN de los VAA se integra en una región específica del cromosoma 19q13.3 denominada AAVS1 y permanecen en forma latente. Después, la co-infección en la célula de un virus colaborador (Ad o herpes virus) activa al VAA a entrar en el ciclo lítico, en el cual se replica el genoma, se expresan los genes virales y se producen los viriones.<sup>10,15</sup>

En el caso de los rVAA, los ITRs son los únicos elementos virales que se conservan, por lo que pierden la capacidad de integrarse al genoma celular. Cuando los rVAA transducen las células se polimerizan en una estructura cabeza-cola por la unión de sus ITRs; esta formación se denomina concatámero y le confiere estabilidad episomal a los rVAA, manteniéndolos viables para su expresión. Estas estructuras son las responsables de un alto porcentaje de la expresión del transgen.<sup>16</sup>

### Métodos de producción de rVAA

Para la producción de un vector viral recombinante basado en VAA se requieren tres componentes principales:

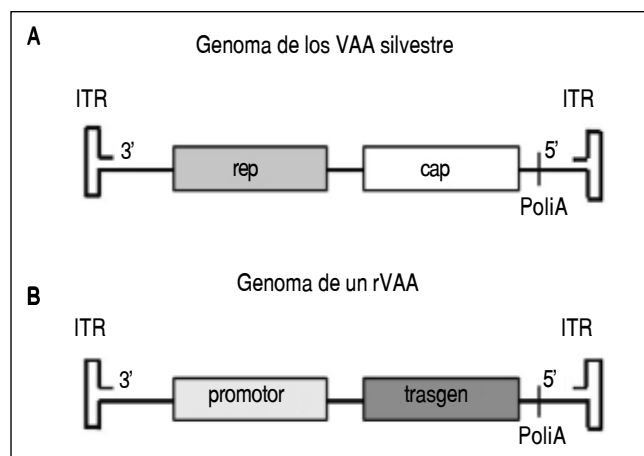


Figura 1. Genoma de los VAA. A. El genoma de los VAA silvestres contienen dos genes virales *rep* y *cap*, el sitio de poliadenilación y los ITRs. B. En los rVAA los genes virales son reemplazados por el cassette de expresión que contiene el promotor y el transgen, los ITRs se mantienen en los vectores recombinantes y son vitales para el empaquetamiento viral.

- El genoma del VAA recombinante que contiene el transgen, elementos reguladores (promotor y cola de poli A) y los ITRs; a todos estos elementos se les conoce como cassette de expresión y son clonados en un plásmido.
- Los genes *rep* y *cap* del VAA silvestre.
- Los genes E2A, E4 y ARN VA del virus colaborador, necesarios para la replicación viral, además de una línea celular que provee la maquinaria básica de biosíntesis. Dentro de las líneas celulares que se utilizan para la producción de los VAA se encuentran las HeLa y las HEK-293 (*Human embryonic kidney*), las cuales expresan establemente los genes E1A y E1B del Ad.<sup>17</sup>

Las primeras producciones de rVAA requerían de la co-infección con Ad silvestres. El principal inconveniente con este sistema era que la producción de vectores VAA contenía Ad silvestres como producto contaminante, por lo que eran necesarios métodos adicionales de purificación para eliminar el virus colaborador, lo que ponía en riesgo la seguridad de los pacientes al administrarles estas preparaciones. En la actualidad, se han descrito diversos sistemas para la producción de rVAA libres de virus colaborador en los cuales los genes E2A, E4 y el ARN VA del Ad se han insertado en un plásmido denominado pHelper.<sup>18</sup> Los principales sistemas para la producción de rVAA libres de virus colaborador son: producción por transfección transitoria y producción en células de insecto.

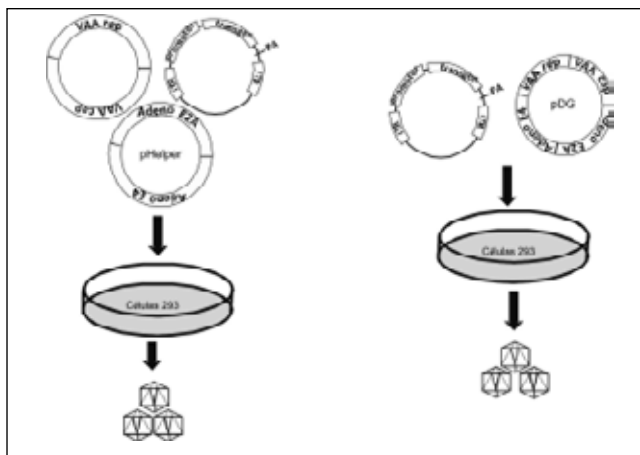


Figura 2. Producción de rVAA. A. En el sistema con tres plásmidos se requiere de uno que contenga el cassette de expresión, el pHelper y el que contiene los genes *rep* y *cap* del VAA. B. En el sistema con dos plásmidos se utiliza el pDG que contiene los genes del VAA silvestre y los genes del virus colaborador. En ambos sistemas los plásmidos son co-transfectados en células HEK-293 para que se produzcan los rVAA.

- Producción por transfección transitoria. Los principales sistemas para la producción de rVAA por transfección transitoria son el sistema con tres plásmidos y el sistema con dos plásmidos. El primer sistema incluye el plásmido que contiene el cassette de expresión, el plásmido que contiene los genes del VAA silvestre y el plásmido pHelper (Figura 2A).<sup>19</sup> Estos plásmidos están disponibles de manera comercial, como el kit denominado Sistema AAV Helper-Free (Stratagene), el cual permite la producción de VAA2 recombinantes. Con este sistema la célula tiene que ser transfectada con los tres plásmidos para que se pueda producir la partícula viral, por lo tanto, la eficiencia de producción es reducida. Posteriormente, para mejorar el procedimiento se implementó un sistema con dos plásmidos, un plásmido que contiene los genes del VAA silvestre y los genes del Ad silvestre conocido como pDG, el cual es co-transfectado junto con otro plásmido que contiene el cassette de expresión (Figura 2B).<sup>20</sup> Este sistema requiere la transfección de la célula con dos plásmidos y se obtienen títulos diez veces mayores que con el primer sistema, logrando producciones hasta de  $10^2$  gv/célula (genomas del vector/célula). Una de las grandes ventajas de estos sistemas es que se obtienen en su mayoría partículas virales completas. Sin embargo, con estos sistemas no se pueden realizar producciones a gran escala.
- Producción en células de insecto. Los Baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae*, son virus de ADN e infectan células de insectos del orden *lepidoptera*. Las principales ventajas del método de producción de VAA que emplea baculovirus es que los promotores fuertes de éste tienen la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas y el sistema permite la realización de modificaciones postraduccionales generando proteínas activas. Para la producción de rVAA en células de insecto se necesitan tres constructos de baculovirus:

- Bac-VP que codifica para las proteínas de la cápside.
- Bac-Rep que codifica para las proteínas que participan en la replicación viral.
- Bac-GOI que contiene el gen de interés flanqueado por los ITRs.

Es una técnica fácil de implementar, que genera producciones a gran escala hasta de  $7.2 \times 10^4$  pv/célula (partículas virales/célula).<sup>21,22</sup> Sin embargo,

la principal desventaja de este sistema es que se produce gran cantidad de partículas virales vacías.

### Purificación de rVAA

La purificación de los rVAA es un paso limitante para la obtención de títulos altos en las producciones por cualquiera de los sistemas y, además, la pureza de las preparaciones de rVAA es importante para la seguridad y eficacia de la transferencia génica en protocolos clínicos. Esto ha propiciado el desarrollo de diversos métodos de purificación, los cuales presentan ventajas y desventajas que se resumen en el cuadro 1.

- Purificación por gradiente de CsCl. Fue el primer método descrito para la purificación de los rVAA. Soluciones de CsCl de diferente concentración sometidas a ultracentrifugación, forman un gradiente de densidad. Los virus centrifugados en gradientes de CsCl forman una banda fácil de coleccionar. Es una técnica eficiente para producir pequeños lotes y se pueden purificar todos los serotipos, además se pueden separar las partículas virales vacías de las completas. Sin embargo, los residuos de CsCl son tóxicos para las células y se presentan agregados de VAA-proteínas, lo que disminuye la infectividad de las partículas virales. Recientemente se ha descrito un método de segunda generación que optimiza el gradiente de centri-

fugación y resulta en una mayor pureza. En este método se incluye un paso de precipitación de los rVAA antes de la centrifugación, lo que mejora el rendimiento de la purificación y disminuye la contaminación con ADN y proteínas.<sup>23,24</sup>

- Purificación por gradiente discontinuo de iodixanol. El iodixanol tiene naturaleza inerte y no-iónica y fue utilizado inicialmente como un compuesto de contraste para rayos X. Los virus centrifugados en gradiente de soluciones de iodixanol son separados dependiendo de su densidad, lo que permite coleccionarlos selectivamente. Es una técnica sencilla de realizar y una de las ventajas importantes es que tiene la capacidad de separar partículas virales vacías de las completas y el iodixanol no es tóxico para la célula. La pureza, así como la cantidad de partículas virales, es mayor a la que se obtiene con el CsCl y similar a la obtenida con HPLC. Con esta metodología se ha logrado purificar  $10^{14}$  pv/mL y se han purificado diversos serotipos como el VAA1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9.<sup>19,23,25</sup> También se ha combinado esta metodología con cromatografía por columnas de heparina o cromatografía de intercambio iónico. Esta combinación permite recuperar cinco veces más cantidad de partículas virales y obtener una mayor pureza.<sup>23</sup>
- Purificación por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución). El HPLC es una de las

Cuadro 1. Ventajas y Desventajas de los diferentes métodos de purificación de rVAA.

Método de purificación	Ventajas	Desventajas
CsCl	Purificación de todos los serotipos. Se puede discriminar entre partículas vacías y completas.	Baja infectividad. Títulos bajos. Producción a baja escala. Es tóxico para las células.
Iodixanol	Purificación de todos los serotipos. Se puede discriminar entre partículas vacías y completas. No es tóxico para las células. Mayor pureza que CsCl.	Títulos bajos. Producción a baja escala.
Cromatografía de intercambio iónico	Método rápido y reproducible. Producciones puras.	No se puede discriminar entre partículas vacías y completas. No se pueden purificar todos los serotipos.
Cromatografía por afinidad	Altamente selectiva. Elevada resolución. Producciones puras.	No se puede discriminar entre partículas vacías y completas. No se pueden purificar todos los serotipos.
Kit comercial	Disminución del tiempo empleado.	Sólo se pueden purificar los serotipos 2 y 5.

técnicas más utilizadas para la purificación de los VAA recombinantes. Con esta técnica se obtienen preparaciones con alta pureza y con más partículas infecciosas. A pesar de que el proceso se realiza en poco tiempo, se necesita equipo y personal altamente especializado, lo que hace que los costos sean elevados.<sup>23</sup>

### **Cromatografía de intercambio iónico**

Esta técnica se basa en la carga neta de los aminoácidos que forman las proteínas virales y su unión a resinas con cierta carga iónica, esta técnica ha permitido el desarrollo de protocolos de purificación que pueden ser usados para diferentes serotipos como el 2, 4, 5 y 8. Este procedimiento es rápido, reproducible, eficiente y se obtienen preparaciones con gran pureza. El 90% de las partículas obtenidas tras la purificación son completas y el título alcanza  $1 \times 10^{10}$  pv/mL. Sin embargo, no se puede discriminar entre partículas vacías y completas.<sup>26</sup>

### **Cromatografía por afinidad**

La cromatografía por afinidad es capaz de separar las partículas virales de proteínas y ADN contaminante, se basa en la interacción entre la cápside viral y un ligando unido a la matriz de resinas. Esta técnica presenta gran afinidad con la unión del virus, por lo que es altamente selectiva y con elevada resolución en la separación de las partículas. Se ha utilizado para purificar el VAA2 y VAA5. Con esta metodología se logran obtener títulos de hasta  $7.6 \times 10^{12}$  pv/mL.<sup>23</sup>

### **Kits comerciales**

Recientemente, están disponibles kits comerciales como el Virakit basados en tecnología de membrana que son útiles para la purificación a pequeña escala de VAA2 y VAA5. La ventaja de este kit es la disminución del tiempo empleado, ya que se realiza en 3 h y se logran obtener títulos de unas  $2.12 \times 10^{11}$  pv/mL.<sup>27</sup>

### **Aplicaciones de rVAA en terapia génica**

Los VAA infectan una gran variedad de tipos celulares, en la actualidad se han desarrollado los diferentes serotipos de VAA como vectores recombinantes para tratar diversas enfermedades como la inmunodeficiencia combinada severa, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Parkinson,

hemofilia A y B, cáncer, fibrosis hepática, entre otras.

### **Amaurosis congénita de Leber**

La amaurosis congénita de Leber es una enfermedad genética que provoca ceguera y es causada por mutaciones en el gen *RPE65* (epitelio pigmentario de la retina de 65 kDa). La proteína codificada por este gen desempeña un papel importante en la visión. En dos modelos murinos deficientes de *RPE65*, la administración del VAA5-smCBA-hRpe65 a una dosis de  $3.9 \times 10^{10}$  gv en la retina, mostró la recuperación de la función visual cuatro días posteriores al tratamiento, así como la prevención de la degeneración de las células del cono.<sup>28</sup> En un estudio clínico fase I, tres pacientes con LCA2 fueron tratados con un VAA2, conteniendo el cDNA de *RPE65* de humano (VAA2.hRPE65v2), se les administró una dosis de  $1.5 \times 10^{10}$  gv por vía subretiniana. Dos semanas posteriores a la administración del vector, los tres pacientes mostraron una mejoría en la función visual y un aumento en la agudeza visual en la sexta semana. No se encontró evidencia de respuesta inmune humoral y celular para las proteínas de la cápside del VAA2 o para la proteína terapéutica.<sup>29</sup>

### **Enfermedad de Parkinson**

Se han desarrollado dos alternativas de tratamiento para la enfermedad de Parkinson que resultan en la síntesis de dopamina, una se basa en el envío de la enzima L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (AADC) responsable de la conversión de la L-DOPA en dopamina; la otra utiliza la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que sintetiza la L-DOPA. En un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson avanzada, la administración intraestriatal de tirosina hidroxilasa (TH) y GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1) enviado en un VAA2/5, a una dosis de  $2.9 \times 10^{10}$  cg (copias del genoma), resultó en la recuperación de la función motora durante seis meses y los animales tratados no desarrollaron discinesia.<sup>30</sup> En un estudio clínico fase I, la administración intraputamina de  $3 \times 10^{11}$  gv del VAA con el cDNA de AADC de humano (VAA2-hAADC-2) en seis pacientes mejoró 46% las funciones motoras durante 96 semanas.<sup>31</sup>

### **Hemofilia B**

La hemofilia B es una enfermedad genética causada por una deficiencia en el factor IX de coagulación (FIX). En un modelo murino *knock-out* para el FIX

se realizó una administración intramuscular de un VAA, conteniendo el gen que codifica para FIX canino (VAA2/8-CMV-cFIX-WPRE) a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  cg por ratón. Se observó una expresión 28% mayor a los niveles normales del cFIX.<sup>32</sup> En 2005 Manno, *et al.* realizaron un estudio clínico fase I/2, en donde siete pacientes fueron tratados con un VAA que expresa el FIX de coagulación. La administración del vector se realizó en la arteria hepática a una dosis de  $12 \times 10^{12}$  gv/kg. La expresión de la proteína terapéutica se detectó por ocho semanas, posterior a eso se observó una disminución en los niveles de FIX y un aumento en los niveles de transaminasas. Estudios posteriores indicaron que la destrucción de los hepatocitos transducidos fue ocasionada por la respuesta inmune celular.<sup>33</sup> El resultado más prometedor se obtuvo en un estudio clínico fase I, en donde la administración de  $2 \times 10^{11}$  gv/kg del VAA2-FIX en el músculo esquelético de ocho pacientes con hemofilia B mostró ser seguro y la expresión de la proteína se mantuvo por los cinco meses del experimento. Posteriormente, a los tres y medio años de la administración, la biopsia muscular demostró la expresión del transgen y de la proteína en un paciente.<sup>34</sup>

### **Inmunodeficiencia combinada severa**

La inmunodeficiencia combinada severa fue una de las primeras enfermedades en las que se aplicó terapia génica para su tratamiento empleando vectores retrovirales. Esta enfermedad es ocasionada por deficiencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA). La administración intravenosa o intramuscular de  $3 \times 10^{11}$  pv del VAA9 o VAA1 conteniendo el gen ADA humano en un modelo en ratón con deficiencia de ADA, logró incrementar la actividad de la enzima y la población de linfocitos periféricos, posterior a la administración del vector.<sup>35</sup>

### **Fibrosis hepática**

La fibrosis hepática resulta de la acumulación de un exceso de componentes de matriz extracelular causado por la activación de células estelares hepáticas (CEH). Una sola administración del VAA5 con el factor de crecimiento para hepatocitos (VAA5-HGF) a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  gv por vena porta, resultó en la disminución de la fibrosis hepática al suprimir la activación de CEH y la actividad de marcadores fibrogénicos en dos modelos murinos de fibrosis hepática (LDB y CCl<sub>4</sub>). La expresión de la proteína se mantuvo durante 12 semanas.<sup>36</sup>

## **Cáncer**

La mayoría de los estudios en cáncer se han realizado en modelos experimentales. La transferencia génica de *p53* es considerada como una opción terapéutica para el cáncer hepatocelular. La transducción de células de hepatoma, denominadas Hep3B (deficientes de *p53*), con VAA2 conteniendo *p53* a una dosis de 10 MOI (multiplicidad de infección) en combinación con doxorrubicina, incrementó 380% la expresión de la proteína, logrando una disminución de la proliferación de células Hep3B. Por otra parte, en un modelo de retinoblastoma en ratas, la expresión de IFN- $\beta$  (interferón beta) utilizando VAA2 a una dosis de  $1 \times 10^9$  pv/mL administrados por vía intravitreal, demostró efectos anti-tumorales.<sup>37,38</sup>

### **Retinitis pigmentosa**

La retinitis pigmentosa es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por muerte de los fotorreceptores y es causada por mutaciones en el gen que codifica para la rodopsina (*RHO*). En un modelo murino la expresión de RH0301, utilizando VAA (VAA5-RH0301) a una dosis de  $2 \times 10^9$  gv, logró disminuir la degeneración de la retina y el grosor de la capa nuclear externa. La administración del vector se realizó en la retina.<sup>39</sup>

## **CONCLUSIONES**

Los rVAA tienen gran potencial como herramienta para la transferencia génica, la expresión estable y por largos periodos de la proteína terapéutica, combinado con su baja inmunogenicidad, los hacen vectores atractivos para terapia génica. El uso de los diferentes serotipos de VAA ha incrementado su potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades. Un gran número de sistemas de producción y purificación se han descrito para producir VAA en títulos altos y con la pureza requerida para su aplicación clínica. En la mayoría de los estudios clínicos realizados con VAA se observaron efectos benéficos y han demostrado ser seguros para los pacientes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a la Dra. en C. Ana Sandoval-Rodríguez por su valiosa colaboración en la revisión de este artículo.

REFERENCIAS

1. Pañeda A, Varnell L, Mauleon I, Cretazz J, Bertraondo P, Timmermans E, et al. Effect of Adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution on mice of both genders. *Hum Gene Ther* 2009; 20(8): 908-17.
2. Mao H, James T Jr, Schwein A, Shabashvili AE, Hauswirth WW, Gorbatyuk MS, Lewin AS. AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther* 2011; 22(5): 567-75.
3. Zhang Y, Duan D. Novel Mini-Dystrophin Gene Dual Adeno-Associated Virus Vectors Restore Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression at the Sarcolemma. *Hum Gene Ther* 2011; 22(1): 1-6.
4. Jooss K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: Implications for gene therapy. *Gene Ther* 2003; 10(11): 955-63.
5. Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(6): 2077-81.
6. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 2008; 82(3): 1399-406.
7. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-associated defective virus particles. *Hum Gene Ther* 1965; 13(149): 754-6.
8. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediated complex formation between AAV and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5808-12.
9. Girod A, Wobus CE, Zadori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, et al. The VP1 capsid protein of adenoassociated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 2002; 83(5): 973-8.
10. Berns K. Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 1990; 54: 316-29.
11. Merten OW, Gény Fiamma C, Douar AM. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* 2005; 12(Suppl. 1): S51-S61.
12. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998; 72(2): 1438-45.
13. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999; 5(1): 78-82.
14. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999; 5(1): 71-7.
15. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991; 10(12): 3941-50.
16. Yang J, Zhou W, Zhang Y, Zidon T, Ritchie T, Engelhardt JF. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* 1999; 73(11): 9468-77.
17. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1): 59-74.
18. Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 1998; 5(7): 938-45.
19. Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, Samanta A, Toelen J, Debyser Z, Wilson JM. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum Gene Ther* 2010; 21(10): 1259-71.
20. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998; 9(18): 2745-60.
21. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13(16): 1935-43.
22. Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* 2009; 17(11): 1888-96.
23. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1996; 6(6): 973-85.
24. Ayuso E, Mingozzi F, Montane J, Leon X, Anguela XM, Haurigot V, et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* 2010; 17(4): 503-10.
25. Van der Perren A, Toelen J, Carlon M, Van den Haute C, Coun F, Heeman B, Reumers V, et al. Efficient and stable transduction of dopaminergic neurons in rat substantia nigra by rAAV 2/1, 2/2, 2/5, 2/6.2, 2/7, 2/8 and 2/9. *Gene Ther* 2011; 18(5): 517-27.
26. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, et al. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther* 2009; 20(9): 1013-21.
27. Duffy AM, O'Doherty AM, O'Brien T, Strappe PM. Purification of adenovirus and adeno-associated virus: comparison of novel membrane-based technology to conventional techniques. *Gene Ther* 2005; 12(Suppl. 1): S62-S72.
28. Pang J, Boye SE, Lei B, Boye SL, Everhart D, Ryals R, Umino Y, et al. Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency. *Gene Ther* 2010; 17(7): 815-26.
29. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358(21): 2240-8.
30. Björklund T, Carlsson T, Cedertfjäll EA, Carta M, Kirik D. Optimized adeno-associated viral vector-mediated striatal DOPA delivery restores sensorimotor function and prevents dyskinesias in a model of advanced Parkinson's disease. *Brain* 2010; 133: 496-511.
31. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, et al. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 2010; 18(9): 1731-5.
32. Wang L, Louboutin JP, Bell P, Greig JA, Li Y, Wu D, Wilson JM. Muscle-directed gene therapy for hemophilia B with more efficient and less immunogenic AAV vectors. *J Thromb Haemost* 2011; 9(10): 2009-19.
33. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12(3): 342-7.
34. Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, Sommer J, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* 2006; 14(3): 452-5.

35. Silver JN, Elder M, Conlon T, Cruz P, Wright AJ, Srivastava A, Flotte TR. Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer for the potential therapy of adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency. *Hum Gene Ther* 2011; 22(8): 935-49.
36. Suzumura K, Hirano T, Son G, Iimuro Y, Mizukami H, Ozawa K, Fujimoto J. Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice. *Hepatol Int* 2008; 2(1): 80-8.
37. Chen CA, Lo CK, Lin BL, Sibley E, Tang SC. Application of doxorubicin-induced rAAV2-p53 gene delivery in combined chemotherapy and gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 303-9.
38. Shih CS, Laurie N, Holzmacher J, Spence Y, Nathwani AC, Davidoff AM, Dyer MA. AAV-mediated local delivery of interferon-beta for the treatment of retinoblastoma in preclinical models. *Neuromolecular Med* 2009; 11(1): 43-52.
39. Mao H, James T Jr, Schwein A, Shabashvili AE, Hauswirth WW, Gorbatyuk MS, Lewin AS. AAV delivery of wild-type

rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther* 2011; 22(5): 567-75.

*Reimpresos:*

**Mayra Mena-Enriquez**

Instituto de Biología Molecular en Medicina  
y Terapia Génica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud

Universidad de Guadalajara

Sierra Mojada, Núm. 950

Col. Independencia

44340, Guadalajara, Jal.

Tel. y fax: (52) 33 1058-5317

Correo electrónico: mayra\_mena7@hotmail.com

*Recibido el 30 enero 2012.*

*Aceptado el 3 de agosto 2012.*