

**PREVALENCIA COMBINADA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA LOS
VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS (AAV) ENTRE LOS SEROTIPOS AAV1, AAV2
Y AAV9 DE UNA MUESTRA DE POBLACIÓN CON FALLA CARDÍACA Y OTRA DE
POBLACIÓN SANA EN EL ÁREA METROPOLITANA DE BUCARAMANGA**

JULIETH ANDREA SIERRA DELGADO, MD.

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: MAGISTER EN CIENCIAS
BÁSICAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR:

MELVIN YESID RINCÓN ACELAS, MD.

PhD en Ciencias Biomédicas.

CODIRECTORES:

CLARA INÉS VARGAS CASTELLANOS, MD.

Ms.C en Genética Médica.

NORMA C. SERRANO DÍAZ, MD.

Ms.C en Genética Médica.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2018

A mi mamá, mi eterno apoyo,
a mi hermano, mi papá, mi nona, mi tía y
a toda mi familia, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Doctor Melvin Rincón y mis codirectoras la Doctora Clara Vargas y la Doctora Norma Serrano, por toda su ayuda, formación, conocimiento y colaboración durante mi maestría.

A mi mamá Lina María, y a toda mi familia por ser mi apoyo constante, por su disposición y paciencia durante estos años.

A mis compañeros de posgrado, Yezid Ardila, César Bermúdez y especialmente a Jorge Silva por su ayuda, su amistad y sus consejos.

A todas las personas del departamento de investigaciones, el grupo de Falla Cardíaca y el laboratorio de genómica y metabolismo y biotecnología de la FCV, en especial a la Doctora Elizabeth Guío, por su ayuda y paciencia, a la Doctora Doris Quintero por su conocimiento y colaboración y a Laura González, por su calidez y compañía en las largas jornadas de trabajo.

Al maravilloso grupo del departamento de ciencias básicas de la UIS, y al Doctor Gustavo Contreras, por sus años de amistad, orientación, consejos y confianza.

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (COLCIENCIAS) por el apoyo financiero (Proyecto código 656671250485, FP44842-307-2016)

Finally, to all the wonderful people at the Meyer Lab in Columbus, Ohio, especially to Doctor Kathrin Meyer and Doctor Shibi Likhite, for their patience, friendship, knowledge and support.

Without you this project would not have been possible.

Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Marco teórico y estado del arte	20
1.1. Generalidades de terapia génica y enfermedades cardiovasculares	20
1.2. Características de los Virus Adenoasociados	24
1.2.1. Vectores virales adenoasociados	29
1.3. Respuesta inmune contra los Virus Adenoasociados	31
1.4. Estrategias para determinar los niveles de NAb	34
1.4.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	35
1.4.2. Ensayo de Inhibición de la Transducción <i>in vitro</i>	36
1.4.3. Ensayo de Inhibición de la Transducción <i>in vivo</i>	37
1.5. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes en la población	38
1.5.1. Variabilidad geográfica	38
1.5.2. Edad.	39
1.5.3. Sexo	40
1.5.4. Reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes.	40
1.5.5. Otros factores que inciden en la prevalencia de anticuerpos neutralizantes.	41

2. Objetivos	43
2.1. Objetivo General	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. Materiales y métodos	44
3.1. Protocolo de determinación de anticuerpos neutralizantes	46
3.1.1. Día 1: Preparación de la placa de células.....	47
3.1.2. Día 2: Preparación y transferencia de placa de suero.	48
3.1.3. Día 3: Determinación de actividad de gen reportero.	51
3.1.4. Día 4: Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes.....	52
3.2. Aspectos éticos.....	52
3.3. Análisis estadístico.....	53
4. Resultados	54
4.1. Estandarización de la técnica de determinación de anticuerpos neutralizantes <i>in vitro</i>	54
4.2. Características sociodemográficas de la muestra.....	58
4.2.1. Características sociodemográficas del grupo casos.	58
4.2.2. Características sociodemográficas de los participantes del grupo control.....	62
4.3. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados, serotipos AAV1, AAV2 y AAV9.....	65
4.3.1. AAV Serotipo 1.	66
4.3.2. AAV Serotipo 2.	68

4.3.3. AAV Serotipo 9.	70
4.4. Prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados serotipos AAV1, AAV2 y AAV9	71
4.5. Incidencia de factores socioeconómicos en la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados, serotipos AAV1, AAV2 y AAV9	72
4.5.1. Incidencia de factores socioeconómicos en prevalencia total de anticuerpos neutralizantes.....	73
4.5.2. Incidencia de factores socioeconómicos en prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra serotipos AAV1, AAV2 y AAV9.....	75
5. Discusión.....	77
6. Conclusiones	84
Referencias bibliográficas.....	86
Apéndices.....	97

Lista de figuras

Figura 1. Tasa de mortalidad por falla cardíaca en Colombia (2016)	21
Figura 2. Homología entre los serotipos de AAV y su clasificación en grupos genéticos	25
Figura 3. Preparación de la placa de suero.	49
Figura 4. Curvas de calibración para determinación del MOI en el serotipo AAV9.....	55
Figura 5. Curvas de calibración para determinación del MOI en los serotipos AAV1 y AAV2..	56
Figura 6. Efecto del tratamiento con neuraminidasa en ensayo de neutralización de una muestra con título previamente conocido.....	57
Figura 7. Localización geográfica de origen/ procedencia el grupo casos	60
Figura 8. Acceso a servicios públicos en el grupo casos	60
Figura 9. Estadío de falla cardíaca de los participantes del grupo casos al momento de la toma de muestra según criterios AHA.....	61
Figura 10. Procedencia geográfica de los participantes del grupo control..	64
Figura 11. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 en participantes del grupo casos y el grupo controles.	66
Figura 12. Títulos de NAb anti- AAV1 en participantes del grupo casos y grupo control	68
Figura 13. Títulos de NAb anti-AAV2 en participantes del grupo casos y grupo control	69
Figura 14. Títulos de NAb anti AAV9 en participantes del grupo casos y grupo control.....	71
Figura 15. Prevalencia combinada en muestras positivas del grupo casos y grupo control.	72
Figura 16. Curva ROC del modelo de regresión logística binomial.....	74

Lista de tablas

Tabla 1. Principales vectores virales utilizados en terapia génica in vivo.....	23
Tabla 2. Tropismo tisular de los AAV más prevalentes en la naturaleza.....	26
Tabla 3. Serotipos de AAV y sus receptores primarios y secundarios.	27
Tabla 4. Principales características sociodemográficas del grupo casos	59
Tabla 5. Comorbilidades y otros antecedentes de los participantes del grupo casos.....	62
Tabla 6. Principales características sociodemográficas de los participantes del grupo control....	63
Tabla 7. Comorbilidades y otros antecedentes en los participantes del grupo control.	65
Tabla 8. Porcentaje de muestras NAb- anti AAV1 positivas con reacción cruzada con AAV2 o 9 en participantes del grupo casos y el grupo control.....	67
Tabla 9. Porcentaje de muestras NAb anti AAV2 positivas con reacción cruzada con AAV1 o AAV9 en el grupo casos y el grupo control.....	69
Tabla 10. Porcentaje de muestras NAb- anti-AAV9 positivas con reacción cruzada con AAV1 o AAV2 en grupo casos y en grupo control.....	70
Tabla 11. Variables incluidas en el modelo de regresión logística binomial.....	74
Tabla 12. Variables incluidas en el modelo de regresión logística multinomial	76

Lista de apéndices

Apéndice A- Variables recolectadas en los participantes del estudio..... 97

Abreviaturas

°C: Grados Celsius

AAV: Virus adenoasociados

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHA: *American Heart Association*

ARN: Ácido ribonucleico

cm: Centímetros

CO₂: Dióxido de carbono

CREATE: *Cre recombination–based AAV targeted evolution*

DE: Desviación Estándar

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EEUU: Estados Unidos de América

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FC: Falla cardíaca

FCV: Fundación Cardiovascular de Colombia.

FDA: *Food and Drug Agency*

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FGFR1: Receptor de crecimiento fibroblástico 1

GFP: Proteína verde fluorescente

HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293

HGFR: Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo de miocardio

IC: Intervalo de confianza

ITR: *Inverted terminal repeats*

K: Mil

Kb: Kilobases

kD: KiloDaltons

LamR: Receptor de Laminina

mL: Mililitro

MOI: multiplicidad de infección

NA: No aplicable

NAb: Anticuerpos neutralizantes

NC: No conocido

Nm: Nanómetro

OR: *Odds Ratio*

P/S: Penicilina/estreptomicina

PBS: Buffer fosfato salino

PDGFR: Receptor de Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: porcentaje de expresión de gen reportero

PI: porcentaje de inhibición de gen reportero

PPR: Receptores de reconocimiento de patógenos

Rpm: revoluciones por minuto

S100A: *S100 calcium-binding protein A1*

SERCA2a: *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*

SFB: suero fetal bovino

SMN1: *Survival Motor Protein 1*

SNC: Sistema nervioso central

TLR: Receptores *Toll-like*

uL: Microlitro

vg: Genomas virales

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Resumen

Título: Prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra los vectores virales adenoasociados (AAV) entre los serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 de una muestra de población con falla cardíaca y otra de población sana en el área metropolitana de Bucaramanga*

Autor: Julieth Andrea Sierra Delgado**

Palabras Clave: Anticuerpos Neutralizantes, Vector viral Adenoasociado, Falla Cardíaca, Terapia génica, Colombia.

Descripción:

La actividad de los anticuerpos neutralizantes (NAb) contra vectores derivados de virus adenoasociados (AAV) disminuye la eficacia de transducción del vector y consecuentemente, la expresión del transgen. La prevalencia de NAb varía según diferentes factores, incluyendo edad, serotipo de AAV y principalmente, la ubicación geográfica. A pesar de múltiples reportes en la literatura, actualmente no hay reportes de la prevalencia de NAb en Latinoamérica.

El objetivo principal de este trabajo es la determinación de la prevalencia combinada de NAb contra diferentes AAV (serotipos 1, 2 y 9) en pacientes con falla cardíaca (FC) y población sana en Bucaramanga, Colombia.

Los niveles de NAb fueron evaluados en suero de 60 casos con FC y 60 controles utilizando un ensayo de neutralización *in vitro*. El título de neutralización se informó como la primera dilución con inhibición en el gen reportero $\geq 50\%$. Se consideró un título positivo cuando la inhibición se presentó en dilución $\geq 1:50$.

El serotipo que presentó mayor prevalencia de NAb anti AAV en el grupo de casos y controles fue AAV2, seguido de AAV1 y AAV9. 25% de muestras presentaron NAb para dos o más serotipos analizados. La mayoría de muestras positivas para AAV1 (55-75%) y AAV9 (93%) fueron positivas para AAV2, sugiriendo coinfección o reactividad cruzada. No hubo diferencias en prevalencia individual o combinada de NAb entre grupos de casos y controles para ningún serotipo. La presencia de NAb se correlacionó con antecedentes tóxicos, quirúrgicos y hospitalarios en un modelo de regresión logística. La prevalencia de NAb en nuestra población es mayor al rango reportado por la literatura para EEUU, pero menor que otras localizaciones como China o África. Estos resultados constituyen el primer reporte de la prevalencia de NAb anti AAV en Latinoamérica, primer paso para implementar estrategias terapéuticas basadas en vectores AAV en nuestra población.

*Tesis de grado

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de Tesis: Melvin Y. Rincón Acelas, MD, PhD. Codirectores de tesis: Clara Inés Vargas, MD, Ms.C., Norma Cecilia Serrano MD, Ms.C.

Abstract

Title: Combined prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) serotypes 1, 2, and 9 in a sample of patients with heart failure and healthy controls from the metropolitan area of Bucaramanga*

Autor: Julieth Andrea Sierra Delgado**

Keywords: Neutralizing Antibodies, Adeno-associated Viral Vector, Heart Failure, Gene Therapy, Colombia.

Description

The activity of neutralizing antibodies (NAb) against the viral capsid of adeno-associated viral (AAV) vectors decreases the efficiency of vector transduction, thus limiting the expression of the transgene. NAb prevalence varies according to age, serotype, and, most importantly, geographic location. Despite multiple reports in the literature, there are currently no reports of NAb prevalence in Latin-America.

The main aim of this work is to determine the combined prevalence of NAb against different AAV vectors (serotypes 1, 2, and 9) in patients with Heart Failure (HF) and healthy individuals in Bucaramanga, Colombia.

Levels of NAb were evaluated in serum of 60 patients with HF and 60 controls using an *in vitro* inhibitory assay. The neutralizing titer was reported as the first dilution inhibiting $\geq 50\%$ of the gene signal. Titers of $\geq 1:50$ were considered positive.

The serotype that presented the highest prevalence of anti AAV NAb in the case-control group was AAV2, followed by AAV1 and AAV9. 25% of samples presented NAb for two or more of the serotypes analyzed. Most of positive cases for AAV1 (55-75%) and AAV9 (93%) were also positive for AAV2, suggesting coinfection or cross-reactivity. There were no differences in individual or combined prevalence of NAb for any serotype between patient and control group. Presence of NAb was correlated with previous exposure to toxics, hospitalization and surgery in a logistic regression model. The prevalence of NAb in our population is higher than reported in the literature for the US, but lower than other locations such as China or Africa. These results constitute the first report of the prevalence of NAb anti AAV NAb in Latin-America, being the first step to implement therapeutic strategies based on AAV vectors in our population.

*Thesis Project

** Faculty of Health, School of Medicine, Master in Basic Biomedical Sciences. Thesis director: Melvin Y. Rincón Acelas, MD, PhD. Thesis Co-directors: Clara Inés Vargas, MD, Ms.C., Norma Cecilia Serrano MD, Ms.C.

Introducción

La terapia génica es una área del conocimiento que busca la inserción de material genético en células previamente tratadas (*ex vivo*) o de manera directa (*in vivo*) para el tratamiento o corrección de una enfermedad (Daya & Berns, 2008). En la terapia génica *in vivo*, el material genético puede insertarse directamente en un tejido deseado o con ayuda de un virus modificado (denominado vector viral) que sirve como vehículo para introducir el material genético exógeno en el núcleo de una célula (Misra, 2013).

Dentro de las diferentes opciones disponibles, los vectores derivados de virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés *Adenoassociated Virus*) constituyen una opción terapéutica de amplio uso (Greenberg, 2017). Actualmente los vectores virales basados en AAV son ampliamente utilizados en estudios preclínicos y ensayos clínicos de patologías monogénicas, como hemofilia o fibrosis quística y otros de origen multifactorial como falla cardíaca o cáncer, con niveles variables de éxito (Rincón *et. al.*, 2015). Su limitada inmunogenicidad, bajo riesgo de mutagénesis insercional y expresión a largo plazo, entre otros beneficios han incrementado su popularidad y tasa de éxito (Greenberg, 2017).

Dado que los AAV se encuentran en la naturaleza, es posible que tanto humanos como animales hayan tenido exposición previa a algunos de los serotipos de AAV sin haber presentado sintomatología (Calcedo *et. al.*, 2009). Sin embargo, esta exposición a uno o varios serotipos estimula la respuesta del sistema de inmunidad humoral, generando anticuerpos contra la cápside viral conocidos como anticuerpos neutralizantes (NAb) (Jungmann & Rapti, 2017). Niveles

elevados en sangre de NAb impiden la entrada del vector en la célula, disminuyen la eficiencia en la transducción y por lo tanto disminuyen la expresión del gen que transporta el vector viral (Mingozzi & High, 2013). Niveles elevados de NAb anti-AAV constituyen uno de los principales factores para la selección de casos participantes en ensayos clínicos y en general, el éxito de la terapia génica basada en vectores AAV. Consecuentemente, los casos con títulos positivos elevados de NAb (Greenberg *et. al.*, 2015) son inmediatamente excluidos de la mayoría de los ensayos clínicos con vectores AAV.

Diversos estudios han evaluado la prevalencia de NAb contra diferentes serotipos de AAV en diferentes poblaciones (incluyendo población sana o casos con patologías específicas). Se ha descrito que los títulos de NAb anti AAV varían entre los grupos evaluados principalmente debido a su localización geográfica, sexo y edad (Calcedo *et. al.*, 2009, Calcedo *et. al.*, 2011, Greenberg *et. al.*, 2015), con variaciones significativas según el serotipo evaluado (Rincón *et. al.*, 2016). Los resultados indican que la prevalencia de NAb puede llegar a ser tan alto como 60% en población sana al evaluar un serotipo más prevalente en la naturaleza, el AAV2, (Calcedo *et. al.*, 2009). Otro serotipos menos prevalentes como el AAV6, presentan un porcentaje de prevalencia de NAb que alcanza un 37% en población sana (Boutin *et. al.*, 2010). Adicionalmente, se han reportado grupo casos de reactividad cruzada, donde anticuerpos contra serotipos prevalentes en la naturaleza, como el AAV2, reconocen residuos de cápsides de otros serotipos, generando actividad neutralizante (Thwaite *et. al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de la importancia de caracterizar las diferentes poblaciones y la posibilidad de que la terapia génica se constituya en una herramienta terapéutica coadyuvante en los próximos años para diversas patologías, no se tienen datos de prevalencia de NAb contra ningún serotipo de AAV en población Latinoamericana, sana o con alguna patología específica.

De igual manera, en nuestra población la falla cardíaca (FC) continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública, con una prevalencia de aproximadamente 1-2% de la población adulta en edad productiva y un 10% de la población mayor de 70 años en países desarrollados (Ponikowski *et. al.*, 2015). En Colombia, se estima que un 2,3% de la población (1,097,201 de habitantes) padecen de FC (Gomez, 2016). Investigación reciente ha dilucidado mecanismos moleculares claves en la progresión y fisiopatología de la falla cardíaca, descubriendo genes que potencialmente pueden ser usados en terapia génica (Rincon *et. al.*, 2014). Recientemente concluyó la fase 2b del estudio CUPID 2, en el cual se usó el gen de la proteína sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) junto al vector AAV1 (Greenberg *et. al.*, 2016). Aunque el estudio CUPID 2 no encontró diferencias significativas en términos de mejoría de la función sistólica en el grupo control versus el tratado (Greenberg *et. al.*, 2016), si evidencio que el uso de vectores AAV no constituyen un mayor riesgo para casos con FC. Por lo anterior, el uso de vectores AAV en terapia génica para la FC continúa siendo prometedor, especialmente al tener en cuenta resultados de ensayos preclínicos con otras moléculas involucradas en el ciclo del calcio en los cardiomiocitos, tales como la *S100 calcium-binding protein A1* (S100A) (Hulot, Ishikawa & Hajjar, 2016).

Por lo tanto, es necesario recolectar información adicional sobre el serotipo óptimo de AAV para la transducción cardíaca en humanos. Para este fin, se requieren estudios adicionales que caractericen la interacción entre factores intrínsecos del paciente y el vector, así como los mecanismos de generación a la respuesta humoral a múltiples serotipos y la reactividad cruzada de los mismos (Greenberg, 2017). Adicionalmente, uno de los principales criterios de exclusión para casos participantes de ensayos clínicos basados en AAV, fueron los niveles de NAb contra el serotipo utilizados y otros serotipos prevalentes en la población estudiada (Greenberg *et. al.*, 2015).

Los principales serotipos de AAV usados en FC son aquellos AAV con tropismo principalmente cardíaco, donde se incluyen los AAV1, AAV2 y AAV9, siendo el AAV9 el serotipo con mayor afinidad y por lo tanto el más prometedor para futuros ensayos clínicos (Bish, *et. al.*, 2008)

En este escenario, es fundamental caracterizar la población Latinoamericana, especialmente la población colombiana, y establecer la prevalencia de NAb ante vectores AAV para permitir la implementación de ensayos clínicos en las patologías de más alto impacto para nuestro sistema de salud, como la FC. Así mismo, debido a la alta relación en la seropositividad entre diferentes serotipos de AAV, se hace necesario no sólo establecer la prevalencia de NAb contra un serotipo, sino evaluar la prevalencia combinada de los principales serotipos utilizados para terapia génica en FC en nuestra región. De esta manera, se podría establecer un perfil inicial de seropositividad en la población colombiana, correlacionando la presencia de NAb contra más de un serotipo con variables sociodemográficas, identificando posibles predictores de positividad contra múltiples serotipos.

1. Marco teórico y estado del arte

1.1. Generalidades de terapia génica y enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un problema importante de salud pública debido a su pobre pronóstico a largo plazo y grandes costos de atención de salud, siendo la principal causa de muerte en cerca de 50% en la población latinoamericana (Bocchi, 2013). Aproximadamente el 1 - 2% de la población adulta en los países desarrollados sufren de FC, con una prevalencia

creciente de $\geq 10\%$ entre las personas de 70 años o mayores (Ponikowski *et. al.*, 2015). Aunque la FC se considera endémica en países desarrollados, en los últimos años se ha observado una tendencia importante hacia la disminución de la mortalidad, las hospitalizaciones y las complicaciones de esta (Ponikowski *et. al.*, 2015). Sin embargo, esta disminución no se evidencia en los países en vía de desarrollo, donde las ECV y en especial la FC constituyen una gran carga al sistema de salud (Bocchi, 2013). Se estima que en Latinoamérica, la FC y sus complicaciones derivadas son responsables del 6,3% de las muertes totales (Bocchi, 2013). La tasa de mortalidad por FC en Colombia durante el 2016 fue de 4,46 muertes por cada 100.000 habitantes, siendo Santander uno de los departamentos con mayor tasa de mortalidad (7,76 muertes por 100.00 habitantes) (Figura 1) (SISPRO, 2018). Una particularidad en la epidemiología de la FC en América Latina es su etiología, aunque la FC de origen isquémico sigue siendo la principal causa de FC, su proporción se encuentra disminuida, debido a un aumento en la contribución de otras causas de FC como fiebre reumática, enfermedad de Chagas e hipertensión (Bocchi, 2013).

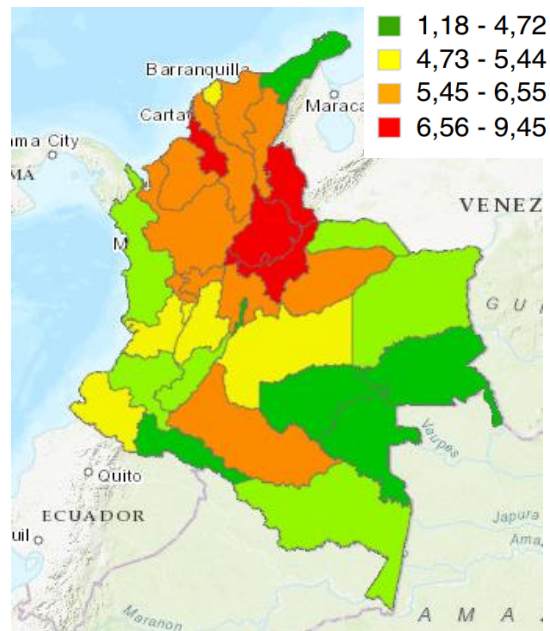


Figura 1. Tasa de mortalidad por falla cardíaca en Colombia (2016). Imagen tomada del Sistema integral de la información social, SISPRO (2018)

Aunque las terapias farmacológicas y no farmacológicas disponibles proveen una mejoría clínica notable y disminuyen la progresión de las ECV, su grave impacto en el sistema de salud y alta mortalidad hacen necesarios estudios orientados a ofrecer nuevos enfoques terapéuticos (Greenberg, 2017). Avances recientes en la cardiología molecular han permitido dilucidar algunas vías, proteínas y genes implicados en la inducción y progresión de la FC (Shareef, Anwer, & Poizat, 2014). Entre las diferentes vías moleculares alteradas en FC, se destaca la desregulación de la vía responsable del metabolismo del calcio en los cardiomiocitos (Greenberg, 2017). El control del flujo de calcio en los cardiomiocitos está dado por una serie de canales y enzimas que incluyen el intercambiador de sodio/calcio, el canal de calcio de tipo-L, el receptor de rianodina y la actividad de la ATPasa 2a del retículo endoplásmico (SERCA2a), en conjunción con coadyuvantes como la proteína S100A (Greenberg, 2017). Estos campos de investigación emergentes permiten la identificación de marcadores moleculares que pueden utilizarse como objetivos terapéuticos para FC usando la terapia génica (Rincon *et. al.*, 2014).

La terapia génica es una técnica que busca la inserción de material genético para el tratamiento o corrección de una enfermedad. Esta inserción puede realizarse *ex vivo*, en células previamente tratadas que luego se suministran al paciente o *in vivo*, donde se realiza de manera directa (Misra, 2013). Las estrategias de transferencia génica *in vivo* se fundamentan en la elección de 3 pilares básicos: el gen a transferir, el tejido blanco en el que se introduce el gen, y el vector que se utiliza para facilitar la entrada del gen (Ibraheem, Elaissari, & Fessi, 2014). Entre los factores a considerar al escoger el vector más apropiado se encuentra el potencial de unión y entrada a la célula diana, la transferencia adecuada del material genético al núcleo, la habilidad de expresión prolongada del inserto y su ausencia de toxicidad o respuesta inmune (Daya & Berns, 2008). En el caso del uso de terapia génica como opción terapéutica para FC, la habilidad para realizar transducción del

material genético en la mayor cantidad de miocardio posible es esencial para obtener una respuesta terapéutica. Esto debido a que la totalidad del músculo cardiaco sufre cambios progresivos en la estructura y función debido al aumento del estrés en la pared regional y la influencia de sistemas neurohormonales que se activan en respuesta a la injuria (Greenberg, 2017).

Dentro de las estrategias que se pueden utilizar para la transferencia del material genético se encuentran los vectores virales y no virales. (Misra, 2013). Entre los vectores virales utilizados se encuentran aquellos derivados de los lentivirus, los adenovirus, AAV y virus de herpes simple, cuyas principales características pueden encontrarse en la tabla 1 (Misra, 2013; Rincon *et. al.*, 2015).

Tabla 1.

Principales vectores virales utilizados en terapia génica in vivo.

VECTOR	Lentivirus (Retrovirus)	Adenovirus	AAV	Virus de Herpes Simplex
Material Genético	ARN	ADN doble cadena	ADN Cadena sencilla (Doble en parte de ciclo)	ADN doble cadena
Integración en Genoma Hospedero	Si	No	Si (Naturaleza) No (Vector)	No
Tropismo tisular	No	No	Dependiente del serotipo	Sistema Nervioso central
Respuesta inmune	Celular Moderada	Celular severa	Celular baja Presencia de NAb	Celular Moderada

Nota: Tabla basada en información proporcionada por Misra (2013), Rincón (2014) y Mingozzi (2013).

1.2. Características de los Virus Adenoasociados

Los AAV son virus de ADN, de 25 nm, de la familia *Parvoviridae* y el género dependovirus (Daya & Berns, 2008). Los AAV tienen un genoma lineal de 4,7 Kb con dos secuencias palindrómicas invertidas en su región terminal (ITR, *inverted terminal repeats* por sus siglas en inglés) flanqueando dos genes: el gen *Rep*, el cual codifica las enzimas necesarias para la replicación, la actividad endonucleasa y la actividad ATPasa y el gen *Cap*, que produce las proteínas de la cápside viral. El ciclo de vida de los AAV tiene dos etapas: lítica y lisogénica. Una infección productiva (ciclo lítico) por AAV solo puede ocurrir en presencia de un virus adyuvante (adenovirus o herpesvirus); en esta etapa ocurre replicación activa con expresión de genes virales y producción de partículas virales (Weitzman, & Linden, 2012). En ausencia del virus adyuvante el AAV entra a ciclo lisogénico, donde el genoma del AAV se integra de manera específica al cromosoma 19 en la región q13,4. En el ciclo lisogénico, el AAV permanece latente hasta que se produce una infección por adenovirus o herpesvirus, en cuyo caso el AAV entrará a ciclo lítico. La integración específica del genoma viral al cromosoma 19 depende de proteínas codificadas por el gen *Rep* (Daya & Berns, 2008; Weitzman, & Linden, 2012).

El gen *Cap* codifica para las 3 proteínas que conforman la cápside del AAV, llamadas VP1 (87kD), VP2 (72kD) y VP3(62kD), así como la proteína AAP, la cual tiene función de ensamblaje (Weitzman, & Linden, 2012). La cápside viral es conformada por 60 monómeros de las tres proteínas virales, los cuales son ensamblados en forma icosaédrica T=1 a través de interacciones simétricas de eje doble, triple o quíntuple (Agbandje-McKenna, & Kleinschmidt, 2012). La proteína VP3 es la más abundante en la cápside, y se encuentra altamente conservada entre los

serotipos de AAV. La cápside de los AAV presenta 12 regiones superficiales hipervariables alrededor de los picos de interacción de eje triple, las cuales, junto a residuos en VP1 y VP2 confieren características y tropismo a los serotipos (Agbandje-McKenna, & Kleinschmidt, 2012).

Actualmente se han reportado 12 serotipos de AAV humanos y 100 serotipos de primates no humanos (Daya & Berns, 2008; Gao *et. al.*, 2004), los cuales muestran una gran homología entre sus cápsides (Figura 2A). Los serotipos de AAVs están clasificados en 8 grupos genéticos: clados A-F y aislamientos clonales AAV4 y AAV5 (Figura 2B), cada uno de ellos presentando un tropismo celular característico (Tabla 2).

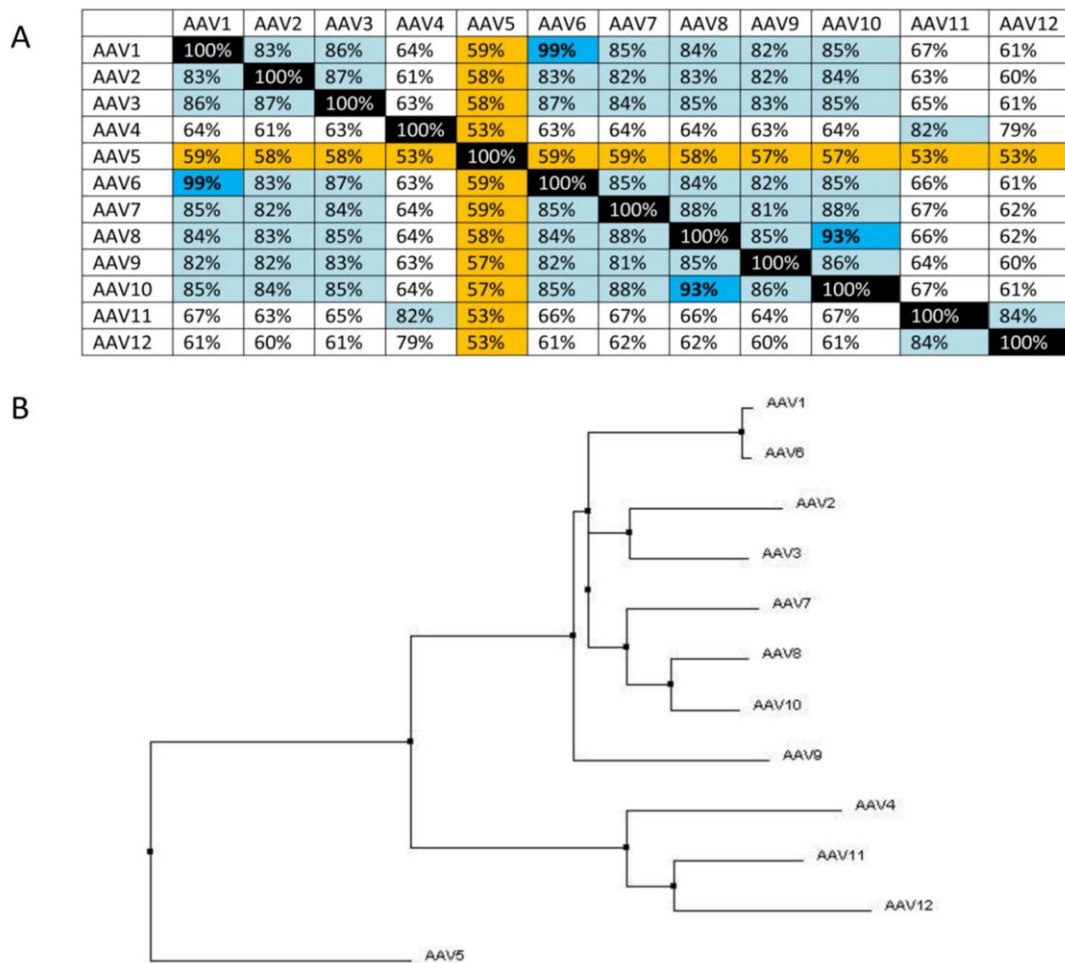


Figura 2. Homología entre los serotipos de AAV y su clasificación en grupos genéticos. **A.** Porcentaje de homología de las cápsides entre diferentes serotipos de AAV. Negro: 100% de homología,

Azul oscuro: Homología mayor al 90%, Azul claro: Homología mayor al 80%, Amarillo: Homología mejor al 60%. **B.** Clasificación de los serotipos AAV en los 8 grupos genéticos. Imagen tomada de Vance, Mitchell & Samulski, (2015).

Tabla 2.

Tropismo tisular de los AAV más prevalentes en la naturaleza

Serotipo/ Tropismo	AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9
Sistema nervioso central	X	X		X	X		X	X	X
Músculo esquelético	X	X	X		X	X	X	X	X
Retina	X			X	X		X	X	
Páncreas	X							X	X
Célula lisa del epitelio vascular		X							
Hígado		X	X					X	X
Riñón		X							X
Corazón	X					X		X	X
Pulmón					X	X			X

Nota: Tabla basada en información proporcionada por Daya y Berns (2008), Rincón (2014), Mingozi (2013) y Vance, Mitchell & Samulski, (2015).

Los AAV utilizan residuos de glucanos para la unión inicial a la superficie celular (Vance, Mitchell & Samulski, 2015). Cada serotipo de AAV tiene un residuo específico para su entrada, cuyas interacciones están estudiadas y caracterizadas en la mayoría de los serotipos humanos (Daya & Berns, 2008) (Tabla 3). Después de la unión a glucanos, se cree que el AAV se involucra

con uno o más receptores proteicos que median el proceso de entrada a la célula; sin embargo, estas interacciones no han sido del todo descritas (Pillay *et. al.* 2016). En los últimos años se ha caracterizado un “receptor esencial” denominado AAVR, necesario para la transducción de vectores derivados de múltiples serotipos de AAV (AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8 y AAV9). El AAVR permite la entrada del virus la célula y su escape del endosoma a nivel intracelular (Pillay *et. al.* 2016; Pillay *et. al.*, 2017). Adicionalmente, se han descrito mecanismos de entrada independientes de AAVR, especialmente en los vectores de linaje AAV4 (Dudek *et. al.*, 2018); sin embargo, se requieren mayores estudios para dilucidar el papel tanto de AAVR como de las vías independientes de AAVR en la infección por los diversos serotipos de AAV y su papel en el tropismo celular.

Tabla 3.

Serotipos de AAV y sus receptores primarios y secundarios.

Serotipo/ Receptor	AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9
Receptor Primario	AAVR N- Ácido siálico	AAVR Heparán Sulfato	AAVR Heparán Sulfato	O- Ácido Siálico	AAVR N-Ácido Siálico	AAVR N- Ácido Siálico Heparán Sulfato	NC	AAVR	AAVR N- Galactosa
Receptor Secundario	NC	FGFR1 HGFR1 Integrina LamR	FGFR1 HGFR1 LamR	NC	PDGFR	EGFR	NC	LamR	LamR

Nota: Adaptado de Vance, Mitchell, & Samulski, (2015). **FGFR1:** Receptor de crecimiento fibroblástico 1, **HGFR:** Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, **LamR:** Receptor de Laminina, **PDGFR:** Receptor de Factor de crecimiento derivado de plaquetas, **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico, **NC:** No conocido

Además de los serotipos naturales, se han desarrollado cápsides sintéticas con tropismos específicos o que puedan evitar la inmunidad humoral preexistente mediante la metodología de evolución dirigida (Grimm *et. al.*, 2008). La evolución dirigida requiere inicialmente generar una librería genómica derivada de mutaciones al azar en el genoma AAV, la cual posteriormente se expresan para crear diversas virus con cápsides nuevas, que luego se someten a un proceso de cribado *in vitro* o *in vivo*, exponiéndola o recuperándolas de tejidos diana o exponiéndola a NAb para detectar aquellas con características mejoradas o modificadas de interés (Maheshri *et. al.*, 2006). Para la generación de AAV sintéticos, la primera metodología exitosa de mutación usada fue la transposición de secuencias de ADN (Grimm *et. al.* 2008), sin embargo más recientemente otros sistemas como CREATE (por sus siglas en inglés *Cre recombination-based AAV targeted evolution*), basado en recombinasa Cre han sido utilizados (Deverman *et. al.*, 2016). Entre los serotipos artificiales más usados actualmente se encuentran el AAV-DJ y el AAV-PHP.B.

El AAV-DJ fue desarrollado por Grimm y colaboradores (2008) mediante transposición de secuencias de ADN homólogas al azar de 8 serotipos diferentes de AAV. Las variantes generadas fueron seleccionadas según su infectividad *in vitro* en líneas celulares de hepatocarcinoma humano (baja permisividad natural para el AAV), exponiéndose posteriormente a sueros con NAb con actividad contra una amplia gama de serotipos. El AAV-DJ tiene una cápside híbrida de tres serotipos de AAV (AAV2, AAV8 y AAV9) con los cuales comparte > 85% de identidad de secuencia, diferenciándose de su pariente más cercano (AAV2) por 60 aminoácidos en la cápside. El AAV-DJ posee las ventajas tanto del AAV2, al ser capaz de lograr una alta transducción de múltiples linajes celulares *in vitro*, con un tropismo hepático específico *in vivo*, como del AAV8 y AAV9, y al ser capaz de evadir NAb y tener una alta infectividad *in vivo* (Grimm *et. al.*, 2008).

El AAV.PHP.B es una variante aislada de una biblioteca de cápsides de AAV9 que contenía una población aleatoria con un inserto de 7 aminoácidos en la proteína VP1. La biblioteca fue generada mediante el sistema de recombinasa Cre, el cual implica un cribado *in vivo* en un modelo animal Cre-positivo (Ratón transgénico Cre- C57BL/6J) (Deverman *et. al.*, 2016). El AAV-PHP.B ha reportado una alta afinidad por el sistema nervioso central, siendo capaz de penetrar la barrera hematoencefálica, con un nivel de eficiencia en la transducción 50 veces mayor que el AAV9, razón por la cual está siendo considerado como un serotipo prometedor para el tratamiento de un alto rango de enfermedades neurológicas (Morabito *et. al.*, 2017). Sin embargo, el AAV-PHP.B ha sido objeto de reciente controversia; un estudio publicado por Hordeaux y colaboradores (2018) reportó la presencia de toxicidad celular aguda posterior a la administración de dosis altas de AAV-PHP.B en primates, en el mismo estudio se sugirió que tropismo aumentado para el SNC del AAV-PHP.B era exclusivo de la cepa C57BL/6J y no era replicable en otros modelos animales. Por este motivo son necesarios mayores estudios de seguridad y tropismo tisular con otros modelos animales para validar los resultados obtenidos en la cepa C57BL/6J.

1.2.1. Vectores virales adenoasociados.

Los vectores AAV son virus modificados, en los cuales la secuencia génica ha sido alterada, siendo su cápside homóloga a los serotipos encontrados en la naturaleza. En el diseño de vectores AAV se reemplazan los genes virales (*Rep* y *Cap*) por el constructo de interés, conservando únicamente las ITR, las cuales son necesarias para la expresión del transgen y empaquetamiento del constructo en la cápside (Weitzman, & Linden, 2012). De esta manera, el vector AAV es incapaz de replicarse, al carecer de los genes *Rep* y *Cap* es incapaz de realizar inserción en el genoma hospedero o de sintetizar proteínas virales (Daya & Berns, 2008).

Los vectores AAV, al igual que los virus se caracterizan por presentar baja respuesta inmune celular, bajo riesgo de mutagénesis insercional, lo cual proporciona una gran ventaja frente a otros vectores virales como los lentivirus (alto riesgo de mutagénesis) y los adenovirus (respuesta inmune celular) (Tabla 1). Por esta razón, los vectores AAV se constituyen en una gran opción terapéutica y son ampliamente utilizados para la transferencia de genes de interés en estudios preclínicos y ensayos clínicos para el tratamiento de patologías monogénicas y enfermedades complejas (Rincon *et. al.*, 2015).

Históricamente, los resultados de los estudios con vectores AAV han tenido niveles variables de éxito (Rincon *et. al.*, 2015), sin embargo el último año varios estudios clínicos con AAV han mostrado resultados prometedores. Un ejemplo de esto es el estudio fase I para hemofilia A realizado por la empresa Biomarin, en el cual una infusión de un vector AAV5-hFVIII-SQ de manera sistémica se asoció con la normalización sostenida del nivel de actividad del factor VIII durante un período de 1 año en seis de los siete participantes, así como estabilización de la hemostasia y una significativa reducción en el uso del factor VIII en todos los participantes, sin eventos de seguridad (Rangarajan, *et. al.*, 2017). Otro resultado prometedor fue reportado en un estudio fase I realizado por Avexis (Mendell, *et. al.*, 2017), donde 15 casos con atrofia muscular espinal tipo 1 recibieron una infusión intravenosa única de AAV9 que contenía el gen SMN 1 (*Survival Motor Protein 1*) (AVX-1). En estos casos la inyección sistémica del vector dio como resultado una mayor supervivencia, un logro superior de los hitos motores y una mejor función motora en comparación a las cohortes históricas de casos con atrofia muscular espinal, sin reportar eventos de seguridad. Finalmente, la terapia de reemplazo genético del gen *RPE65* para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber utilizando el serotipo AAV2 en administración sub-retinal (Luxterna (Spark therapeutics)), terminó el año pasado su estudio fase III de manera

satisfactoria (Russell, *et. al.* 2017), y se convirtió en la primer terapia génica con vectores AAV en ser aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos (Ledford, 2017).

Estos resultados validan el potencial terapéutico de los vectores AAV para el tratamiento de diversas clases de enfermedades (hematológicas, oftalmológicas o neurológicas) y su buen perfil de seguridad, al no presentar eventos de toxicidad en ninguno de los estudios reportados hasta la fecha.

1.3. Respuesta inmune contra los Virus Adenoasociados

A pesar de que la infección por AAV ha sido detectada en diversos tejidos, tanto en animales como en humanos, hasta el momento no se han asociado con ninguna patología (Calcedo & Wilson, 2013). Los AAV se encuentran en la naturaleza, por lo cual tanto humanos como animales de experimentación utilizados en investigación biomédica tienen la probabilidad de haber tenido exposición previa a algunos de los serotipos de AAV y, por tanto, generar respuesta inmune (Jungmann & Rapti, 2017; Mingozi & Büning, 2015). A nivel inmunológico, la cápside del vector AAV es una réplica del virión encontrado en la naturaleza (Daya & Berns, 2008; Mingozi & Büning, 2015), razón por la cual la administración del vector AAV en los ensayos clínicos genera la activación de la respuesta inmune en casos previamente expuestos a los AAV (Mingozi & High, 2013). De igual manera, la administración del vector en casos sin exposición previa genera respuesta inmune, lo cual dificulta su readministración (Mingozi & High, 2011). No obstante las similitudes en la cápside entre los vectores y los AAV presentes en la naturaleza, la administración del vector difiere de la infección natural en tres aspectos: la introducción de un número mayor de

partículas virales al organismo, la ruta de la administración (la exposición natural a AAV usualmente se lleva a cabo por vía aérea) y, la no replicación activa del virus o no presencia del virus adyuvante, lo cual disminuye la respuesta inmune generada (Calcedo & Wilson, 2013).

La primera línea de respuesta que desencadena la infección por AAV es mediada por el sistema inmune innato, el cual reconoce secuencias conservadas en los AAV por los receptores de reconocimiento de patógenos (PPR) TLR-2 y TLR-9, induciendo, respuesta inmune mediada por el factor nuclear k-beta y secreción de Interferón tipo I (Mingozzi & Büning, 2015).

La infección por AAV adicionalmente genera respuesta adaptativa celular mediada principalmente por linfocitos T CD8⁺ (Mingozzi *et. al.*, 2007; Willet & Bennet, 2015). Se ha encontrado que alrededor de dos tercios de adultos mayores de 25 años muestran actividad celular en respuesta a péptidos de la cápside del AAV2 (Basner-Tschakarjan & Mingozzi, 2014) y hasta de 30% de células T reactivas contra epítopes de AAV1 en población sana (Veron *et. al.*, 2012). En los primeros ensayos clínicos de hemofilia se encontró respuesta inmune celular en hepatocitos, debido a que la infusión del vector derivado del serotipo AAV2 provocó una expansión clonal de linfocitos T CD8⁺ específicos para la cápside del virus (Mingozzi & High, 2013). A pesar de los anteriores resultados, la respuesta celular no ha sido tan prevalente en los ensayos clínicos con otros serotipos, por ejemplo, ninguno de los más de 300 casos reclutados en las diferentes fases del estudio CUPID mostró evidencia de respuesta inmune celular para el vector AAV1 (Hulot, Ishikawa & Hajjar, 2016). Por tanto, las implicaciones y mecanismos de la respuesta inmune celular aún no están del todo dilucidados y se requieren mayores estudios sobre la naturaleza y potencia de la respuesta celular, tanto en infección natural, como en el contexto de terapia génica (Veron *et. al.*, 2012).

A pesar de la posible inducción de respuesta celular, el principal obstáculo para la implementación de terapia génica con virus AAV es la generación de inmunidad humoral (Mingozzi & High, 2013). La inducción de anticuerpos por exposición natural a AAV provocan una respuesta humoral potente que compromete la transducción del vector y su persistencia (Halbert *et. al.*, 2006), disminuyendo la expresión del gen y por lo tanto limitando el éxito terapéutico esperado (Jeune *et. al.*, 2013).

La respuesta inmune de tipo humoral puede ser de dos tipos: neutralizante o no neutralizante. Los anticuerpos neutralizantes (NAb) reconocen epítopes en la cápside del virus, inhibiendo su transducción, mientras que los anticuerpos no neutralizantes reconocen los residuos en la cápside del AAV, marcándolo sin bloquear su transducción (Calcedo, 2013; Jeune *et. al.*, 2013). Los primeros ensayos clínicos de vectores AAV en casos con hemofilia B demostraron que los NAb son el principal factor por superar para el establecimiento y mantenimiento de la terapia (Kumar, *et. al.*, 2017). Se ha visto que títulos de 1:17 pueden neutralizar por completo grandes dosis de vector, y, en consecuencia, no se evidencia la expresión del gen terapéutico (Manno *et. al.*, 2006; Boutin *et. al.*, 2010). La actividad de los NAb es dependiente de la vía de administración, es posible evitar el reconocimiento del virus por los NAb al administrar el virus por vía intratecal, o directamente en el órgano diana debido a la baja exposición sistémica del vector una vez presente en estas regiones privilegiadas (Mingozzi *et. al.*, 2013). Debido al efecto de lo NAb en la respuesta terapéutica deseada, casos con títulos positivos de NAb son inmediatamente excluidos de la mayoría de los ensayos clínicos con vectores AAV (Greenberg *et. al.*, 2015).

Cabe acotar que estudios sugieren que las respuestas humoral y celular contra la infección con AAV no están acopladas. Sujetos positivos para anticuerpos contra AAV no presentan reactividad celular contra la cápside y, de igual manera, casos con reactividad celular tienen menores títulos

de anticuerpos contra AAV. Esto puede deberse a que ciertos individuos favorecen una respuesta Th1 al antígeno, mientras otros desarrollan una respuesta Th2 luego de la exposición. (Basner-Tschakarjan & Mingozi, 2014)

1.4. Estrategias para determinar los niveles de NAb

Una adecuada identificación de la presencia y títulos de los NAb es de vital importancia en las primeras fases de los ensayos clínicos con vectores AAV (Mingozi & High, 2013). Actualmente, se han descrito tres diferentes métodos para determinar su presencia en seres humanos o animales (Jungmann & Rapti, 2017):

- 1- La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en ingles *enzyme-linked immunosorbent assay*).
- 2 - El ensayo de inhibición de la transducción *in vitro*
- 3 - El ensayo de inhibición de la transducción *in vivo*

La mayoría de las técnicas utilizan suero como sustrato dada su fácil obtención y significancia clínica, sin embargo, es posible realizar estos estudios usando otros tejidos o incluso líquido sinovial (Mingozi *et. al.*, 2013)

1.4.1 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Ampliamente utilizada en los primeros reportes de anticuerpos contra AAV. La técnica de ELISA indirecto consiste en la fijación de viriones purificados del serotipo a caracterizar en una superficie sólida o pocillo, con un lavado posterior para eliminar los antígenos fijados de manera deficiente o no fijados. Luego de la fijación, los viriones se incuban con diluciones de suero del paciente problema, de manera que los anticuerpos presentes reconozcan los epítopes fijados en el pocillo y se unan específicamente a los mismos. La fase de incubación es seguida de otro lavado donde se descartan los anticuerpos que no han reaccionado con los antígenos fijados. Finalmente, se realiza la detección del complejo antígeno-anticuerpo mediante el uso de un anticuerpo revelador, el cual tiene un epítope de reconocimiento contra las cadenas pesadas de la inmunoglobulina humana, usualmente anti-IgG (Erles, Seböková, & Schlehofer, 1999). Este anticuerpo revelador está marcado con una molécula que emite señales que permiten identificar el número de complejos antígeno-anticuerpo presentes en la placa; la reducción en señal entre diluciones en un 50% comparado con el control determina el título positivo.

Esta técnica presenta grandes ventajas dada su facilidad para implementación, bajo costo comparado de otras técnicas, y la posibilidad de categorizar los anticuerpos presentes (IgA, IgE, IgG, IgM) (Murphy *et. al.*, 2009; Jungmann & Rapti, 2017). Sin embargo, la presencia de anticuerpos en la prueba de ELISA no implica su capacidad de neutralización (Chirmule *et. al.*, 1999), y, aunque existe cierta correlación entre títulos altos de ELISA y de NAb detectados con la técnica *in vitro*, esta correlación no se da en todos los serotipos (Masurier, 2010; Erles, Seböková, & Schlehofer, 1999).

1.4.2 Ensayo de Inhibición de la Transducción *in vitro*.

Actualmente, el ensayo estándar para evaluar la presencia de NAb anti AAV (Meliani *et. al.*, 2015; Jungmann & Rapti, 2017). Esta técnica se fundamenta en mezclar diluciones seriadas de suero de un individuo con una cantidad preestablecida del vector AAV de interés que expresa un gen reportero. La cantidad de vector AAV está relacionada directamente con el serotipo de interés, debido a que diversos serotipos requieren una mayor cantidad de partículas virales debido a su baja eficacia de transducción *in vitro*.

El número de vectores de AAV es expresado como multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés *multiplicity of infection*), y corresponde a la tasa de vectores virales/células utilizadas por pozo. La mezcla del vector y las diferentes diluciones del suero, es incubada con una línea celular permisiva en una placa de 96 o 48 micropozos durante 2 días a 37°C y 5% de CO₂. En este paso es importante añadir un pozo que se usara como control positivo (células incubadas sin suero) y otro como control negativo (células incubadas sin vector viral). Posterior a la incubación, el nivel de expresión es medido según el gen reportero utilizado. El título de anticuerpos es informado como la dilución más alta que inhibe la expresión del 50% del gen reportero con relación al control positivo. (Jungmann & Rapti, 2017; Jeune *et. al.*, 2013; Meliani *et. al.*, 2015).

La técnica de inhibición de la transducción *in vitro* tiene varias ventajas frente a otras técnicas utilizadas en cuanto a su costo-efectividad, facilidad para su realización en el laboratorio y, más importante aún, el alto grado de correlación que tienen sus resultados con el desenlace en ensayos *in vivo* con casos.

A pesar de ser el ensayo más utilizado para la evaluación de NAb, actualmente no existe un protocolo unificado para llevar a cabo el ensayo *in vitro* (Jungmann & Rapti, 2017). Esto genera variaciones de parámetros fundamentales entre los reportes que se han hecho utilizando esta técnica. Entre los factores más importantes de diferencia que pueden afectar tanto la reproducibilidad como la correlación entre los resultados, se encuentran el uso de diferentes genes reporteros, líneas celulares, diluciones de suero, número de partículas virales utilizadas en el ensayo y la adición de adenovirus o adyuvantes (Jungmann & Rapti, 2017; Jeune *et. al.*, 2013; Meliani *et. al.*, 2015; Gupta *et. al.*, 2007; Wang *et. al.*, 2015).

1.4.3 Ensayo de Inhibición de la Transducción *in vivo*

Debido a que el ensayo *in vitro* no evalúa la neutralización por fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y otros componentes sanguíneos y puede presentar problemas de reproducibilidad, algunos investigadores han desarrollado el ensayo de detección de NAb *in vivo* (Jungmann & Rapti, 2017; Jeune *et. al.*, 2013). En este ensayo ratones son inyectados con diferentes diluciones del suero problema de manera posterior o simultánea a una infusión de AAV que expresa un gen reportero (Jeune *et. al.*, 2013; Li *et. al.*, 2015). El título de NAb es definido como la dilución en la cual se redujo la expresión del transgen un 50% comparado con un ratón control inyectado sólo con el vector (Jeune *et. al.*, 2006). El ensayo de neutralización *in vivo* es más sensible que su contraparte *in vitro*. Sin embargo, debido a esta gran sensibilidad, sus resultados se correlacionan en un menor grado con los resultados de transducción en ensayos clínicos *in vivo*, no teniendo una buena correlación entre el ensayo y el comportamiento clínico. De igual manera este ensayo presenta dificultades de implementación debido a su alto costo, dificultad técnica y reproducibilidad (Jeune *et. al.*, 2013).

Por esta razón el patrón de oro para la detección de NAb continúa siendo el ensayo *in vitro*. (Jungmann & Rapti, 2017; Jeune *et. al.*, 2013)

1.5. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes en la población

Desde finales de los años 60s se han llevado a cabo varios estudios poblacionales para determinar la prevalencia de anticuerpos contra los AAV. Los primeros estudios fueron reportados por Blacklow en 1968 (Blacklow *et. al.*, 1968a; Blacklow *et. al.*, 1968b), quien midió la presencia de NAb para los serotipos conocidos a la fecha (AAV1-AAV4). A partir de los primeros ensayos clínicos utilizando vectores derivados de AAV, se empezaron a realizar estudios enfocados en determinar la prevalencia de NAb no sólo en población sana, sino también en casos con enfermedades específicas, para evaluar la posibilidad de utilizar terapia génica con serotipos específicos (Chirmule *et. al.*, 1999). Los serotipos más comunes en investigación básica, preclínica y clínica son los AAV1 a AAV9 y, por ende, los estudios poblacionales de NAb se han centrado en estos. El serotipo más estudiado es el AAV2, y los que presentan porcentajes más altos de seropositividad en todos los estudios son, en orden, el AAV2 y AAV1.

1.5.1. Variabilidad geográfica.

La prevalencia de NAb contra un serotipo de AAV específico ha presentado variación dependiendo de la procedencia de la población estudiada (Jeune *et. al.*, 2013, Calcedo *et. al.*, 2009; Ferla *et. al.*,

2015). Se han realizado estudios poblacionales en países de Asia, África, Oceanía, Europa y Norteamérica, los cuales reportan diferencias entre las prevalencias de NAb para cada serotipo. La prevalencia de NAb en población sana, independiente del serotipo es generalmente mayor en países en vía de desarrollo que en países desarrollados, con excepción de Francia (Veron *et. al.*, 2012; Boutin *et. al.*, 2010) donde se reporta alta prevalencia de NAb contra el serotipo AAV1 (59%) y en Holanda, donde un estudio reportó un gran porcentaje de seropositividad de NAb contra los serotipos AAV1 (79%), AAV5(77%), AAV6 (85%) y AAV8(94%) (Calcedo *et. al.*, 2009))

De igual manera, diferentes estudios indican variación en el porcentaje de población seropositiva entre regiones de un mismo país para un serotipo específico de AAV (Chirmule *et. al.*, 1999; Halbert *et. al.*, 2006; Wagner *et. al.*, 2002; Liu *et. al.*, 2013; Ling *et. al.*, 2015; Corden *et. al.*, 2017). Factores que pueden explicar este fenómeno incluyen variaciones en condiciones socioeconómicas, de vivienda, densidad poblacional, condiciones higiénicas y acceso a servicios de salud entre las poblaciones de los países y regiones y la diferencia en metodología previamente expuesta en el ensayo de NAb *in vitro*. (Jeune *et. al.*, 2013) Sin embargo, ningún estudio ha evaluado a fondo el impacto de variables socioeconómicas y culturales en la presencia de NAb.

Así pues, teniendo en cuenta la excesiva variabilidad en los títulos de NAb según la localización geográfica, aún entre regiones del mismo país, es de destacar el hecho que, hasta el momento, no se han hecho estudios sobre ellos en América Latina, razón por la cual no se ha obtenido ningún dato sobre prevalencia de NAb en población latinoamericana El presente estudio constituye el primer reporte de NAb anti AAV en Latinoamérica. en 3 diferentes serotipos (AAV1, AAV2 y AAV9).

1.5.2. Edad.

Varios estudios han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre diferencias grupos etarios sin importar el serotipo evaluado (Blacklow *et. al.*, 1968a; Blacklow *et. al.*, 1968b; Chirmule *et. al.*, 1999; Halbert *et. al.*, 2006; Wagner *et. al.*, 2002; Calcedo *et. al.*, 2011; Liu *et. al.*, 2013; Ling *et. al.*, 2015). Los títulos de anticuerpos aumentan con la edad y se ha reportado el siguiente comportamiento: desde el nacimiento hasta los 6 meses aproximadamente los títulos se mantienen altos debido a inmunidad materna, para posteriormente bajar hacia los 7-11 meses de edad. Posterior a la maduración del sistema inmune en el primer año de vida, los títulos comienzan a aumentar, coincidiendo con un aumento de exposición a los AAV presentes en la naturaleza, presentándose mayores niveles de NAb posterior a la cuarta década de vida. (Jeune *et. al.*, 2013; Mimuro *et. al.*, 2014).

1.5.3. Sexo.

Existe evidencia conflictiva sobre si hay o no diferencia en la prevalencia de NAb de acuerdo con el sexo de los casos. Algunos estudios han descrito prevalencias significativamente mayores de títulos de NAb anti AAV1 según el sexo de los participantes, teniendo las mujeres un mayor porcentaje de seropositividad (74%) con respecto a los hombres (65%) (Liu *et. al.*, 2013), mientras que en otros no se ha encontrado diferencia significativa en las prevalencias o títulos entre hombres y mujeres (Greenberg *et. al.*, 2015; Ling *et. al.*, 2015).

1.5.4. Reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes.

Varios estudios han analizado la especificidad de la respuesta inmune humoral a la infección con AAV, describiendo una fuerte relación en la seropositividad entre diferentes serotipos de AAV. El

porcentaje de población positiva sólo para un serotipo de NAb es baja en la mayor parte de estudios presentados (Jeune *et. al.*, 2013) en comparación a la población que presenta seropositividad frente a dos o más serotipos de AAV (Halbert *et. al.*, 2006; Boutin *et. al.*, 2010; Li *et. al.*, 2012; Liu *et. al.*, 2013; Ling *et. al.*, 2015, Harrington *et. al.*, 2016). Esta reactividad cruzada frente a varios serotipos de AAV puede deberse a exposición a los diversos serotipos presentes en la naturaleza o bien a reactividad cruzada entre anticuerpos contra sólo un serotipo debido a la homología entre las proteínas de las cápsidas (Daya & Berns, 2008; Thwaite *et. al.*, 2015). Estudios recientes con chimpancés parecen favorecer la segunda hipótesis, debido a que ha encontrado que la infección por sólo un serotipo de AAV induce anticuerpos capaces de neutralizar múltiples serotipos diferentes (Calcedo & Wilson, 2016). Sin embargo, aún faltan mayores estudios para determinar la naturaleza de la seropositividad combinada entre varios serotipos y su relación con factores demográficos y socioeconómicos.

1.5.5. Otros factores que inciden en la prevalencia de anticuerpos neutralizantes.

El estado de salud de la población estudiada puede impactar los resultados de NAb contra los AAV, especialmente en casos con enfermedades que comprometen el sistema inmune (Calcedo & Wilson, 2013) por ejemplo, se encuentran niveles significativamente más bajos de población seropositiva en casos con enfermedad inflamatoria intestinal (van der Marel *et. al.*, 2011) y acidemia metilmalónica (Harrington *et. al.*, 2016) comparada con controles sanos. De manera interesante, casos con acidemia metilmalónica y trasplante de órgano sólido presentan una mayor prevalencia de NAb que casos con la patología sin trasplante, a pesar del estado de inmunosupresión crónica al que se someten los receptores de un trasplante (Harrington *et. al.*, 2016).

Por otra parte, un estudio en China también encontró correlación entre la prevalencia de NAb y contextura física, definido por los tipos de constitución de la medicina tradicional China. Participantes con una mayor contextura presentaban mayor prevalencia de NAb, sugiriendo una posible relación entre estado metabólico, peso o estilo de vida y exposición a AAVs (Ling *et. al.*, 2015).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados (AAV) entre los serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 en una muestra de población con falla cardíaca y otra de población sana en el área metropolitana de Bucaramanga

2.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica de determinación de anticuerpos neutralizantes mediante el ensayo de inhibición de la transducción *in vitro* para los serotipos AAV1, AAV2 y AAV9.
2. Determinar la prevalencia individual de anticuerpos contra los serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 en una muestra de población con falla cardíaca y otra de población sana del área metropolitana de Bucaramanga.
3. Contrastar la prevalencia en casos de anticuerpos neutralizantes contra múltiples serotipos (1, 2 y 9) con los que presentan seropositividad (NAb) contra un solo serotipo.
4. Evaluar la prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra serotipos de AAV 1, 2 y 9 en una muestra de casos con falla cardíaca y población sana en del área metropolitana de Bucaramanga.
5. Correlacionar la presencia simultánea de anticuerpos contra múltiples serotipos con variables como edad, sexo, condiciones socioeconómicas y datos de historia clínica como antecedentes personales y patologías.

3. Materiales y métodos

Se utilizó el suero de 60 casos con falla cardíaca y 60 controles sanos provenientes de la cohorte del estudio “Determinación de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adeno-asociados en casos con falla cardiaca en la Fundación Cardiovascular de Colombia (ANVIAS)” (resolución Colciencias No. 135 del 07 de marzo de 2016; Proyecto código 656671250485, FP44842-307-2016). Los casos fueron captados en el servicio de consulta externa de la clínica de falla cardíaca de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV).

Las variables de inclusión del proyecto fueron:

- Casos mayores de 18 años
- Latinoamericanos residentes en Colombia con diagnóstico de falla cardiaca estadio B o superior (según criterios de la American Heart Association)
- Casos que hubiesen acudido a controles a la clínica de falla cardiaca de la FCV por un mínimo de 6 meses.

Los criterios de exclusión fueron:

- No aceptación de participar en el estudio
- Múltiples transfusiones sanguíneas (definidas como la transfusión de 10 o más unidades de glóbulos rojos, sangre total o hemoderivados a lo largo de la vida)
- Plasmaféresis en los últimos 6 meses

- Paciente seropositivo para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH),
- Paciente inmunosuprimido o en tratamiento con corticoesteroides,
- Trasplante de médula u órgano sólido en los últimos 5 años,
- Infección por Chagas debido a su respuesta inmune diferencial
- Embarazo actual
- Condición preexistente de asma, apnea obstructiva del sueño o enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- Terapia de reemplazo hormonal
- Consumo de 5 o más bebidas alcohólicas en una misma ocasión durante 5 o más días en el último mes.

Los participantes del grupo control fueron pareados por sexo y edad siguiendo los mismos criterios de exclusión.

A cada paciente se le realizó una toma de muestra de sangre periférica por medio de punción venosa antecubital con sistema Vacutainer®, usando dos tubos tapa amarilla de 5 mL. Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 3.200 revoluciones por minuto (rpm) para realizar el fraccionamiento de componentes. El suero fue transferido en crioviales de 1 mL y almacenados a -80°C hasta su procesamiento. Ninguna muestra fue sometida a ciclos de congelación-descongelación. Durante la toma de muestra para la determinación de los NAb anti AAV, se realizó una encuesta a cada paciente para determinar variables epidemiológicas y condiciones socioeconómicas con las cuales se llevó a cabo el análisis estadístico. Se evaluaron más de 90 variables socioeconómicas, de salud, estilo de vida, paraclínicos y acceso a servicios públicos incluyendo edad, sexo, raza, origen, procedencia, condiciones de vivienda, enfermedades previas,

viajes, tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física, entre otros (Anexo 1). Todos los datos del estudio fueron recolectados por personal médico debidamente entrenado por el servicio de biobanco de la Fundación Cardiovascular de Colombia.

3.1 Protocolo de determinación de anticuerpos neutralizantes

La determinación de la presencia y título de NAb en las muestras se realizó a cabo mediante el protocolo de inhibición de la transducción *in vitro*. La técnica se estandarizó para cada serotipo evaluado (AAV1, AAV2, AAV9) teniendo en cuenta la línea celular a utilizar las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293), el MOI y el gen reportero a utilizar. Los vectores de cada serotipo (AAV1, AAV2 y AAV9) con el gen reportero fueron adquiridos de manera comercial de la empresa Vigene Biosciences (Key West Ave, Rockville, Maryland, USA) con el gen reportero proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*) bajo la acción del promotor de citomegalovirus. Para determinar el MOI de cada serotipo de AAV se realizó una curva de calibración con MOI seriados, midiendo la actividad del gen reportero (GFP). Posteriormente se realizaron curvas de dilución con los MOI que mostraban mejor correlación y se realizó una regresión lineal con los resultados de GFP. Se escogieron los MOI con R^2 en regresión lineal más cercana a 1, lo cual indica una mayor correlación entre la señal de GFP y la disminución de la entrada de los virus. (Figuras 3 y 4). Las curvas de calibración eran incluidas en cada ensayo adicional, junto a un control negativo (suero humano) el cual fue proporcionado por el laboratorio de terapia génica del Nationwide Children's Hospital.

Las células utilizadas en el estudio (HEK293, Aligent Technologies®) fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) alto en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) en un frasco de cultivo de 175 cm². Las células eran divididas en proporción 1:3 al alcanzar confluencia $\geq 80\%$ y se mantenían hasta el pase número 20. Posterior al pase 20, las células eran descartadas y una nueva línea celular era iniciada.

Las principales características del protocolo se describen a continuación:

3.1.1 Día 1: Preparación de la placa de células.

Para el ensayo son necesarias dos placas, una placa de células (96 micropozos) y una placa de suero (mezcla de suero), donde se llevarán a cabo las diluciones seriadas y la mezcla con los vectores. Este protocolo trabaja con una concentración de 125K genomas virales (vg)/célula (MOI) para el serotipo AAV1, 5K vg/célula para el serotipo AAV2 y 20K vg/ célula para el serotipo AAV9

- 1- Para asegurar que las células se mantuvieran en la placa durante todo el proceso se realizó un revestimiento de las placas de 96 micropozos con una dilución 1:200 de fibronectina humana (Merck, 1mg/mL) en *Phosphate Buffer Saline* (PBS). La concentración de fibronectina final fue de 2ug/cm². Se utilizaron 100uL de la dilución y se dejó en la cabina por al menos 15 minutos. Luego del tiempo se retiró el sobrenadante de fibronectina con una pipeta al vacío.

- 2- Se tomó el frasco de cultivo que contiene la línea celular HEK293, y en una cabina de seguridad, se removió el medio y se añadió 10 mL de 1xPBS. Las células fueron lavadas cuidadosamente y se removió el PBS.
- 3- Se añadieron 4mL de tripsina-EDTA (0,25%) e incubaron 37°C por 3-5 minutos hasta que las células se despegaron. Se añadieron 8mL medio completo (DMEM con 1% de P/S y 10% de SFB).
- 4- Se tomaron 20uL de la suspensión celular y se diluyeron con 20uL de azul de tripán. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer.
- 5- Se transfirieron 2×10^6 células a un tubo falcon y se centrifugaron a 300 gravedades por 5 minutos. El sobrenadante fue removido y resuspendido en 10 mL de DMEM, con penicilina estreptomicina (P/S).
- 6- Se transfirieron 100 uL de suspensión celular a cada pozo de la placa de 96 micropozos. Esto corresponde a 2×10^5 células por pozo (62500 células /cm²).
- 7- Se transfirió la placa a la incubadora (37°C, 5% CO₂), dejándola incubar por 24 horas.

3.1.2. Día 2: Preparación y transferencia de placa de suero.

3.1.2.1 Preparación de la placa de suero.

Las diluciones del suero se realizaron en el eje vertical de la placa, de la columna A hasta la G, dejando la columna H para el control sin virus (Figura 4). Cada columna representó un ensayo. El volumen final por pozo fue de 100 uL. Cada ensayo fue realizado por triplicado. La preparación de la placa de suero se realizó de la siguiente manera:

- 1- Se transfirieron 150 uL de DMEM con P/S en cada pozo de la columna 1.

- 2- Se realizó una dilución inicial con 12 uL de suero +288 uL de medio de neutralización (DMEM+1% P/S) para una dilución de 1:25.
- 3- Se transfirieron 150 uL de la primera dilución al pozo A1. Se mezcló pipeteando suavemente 3 veces.
- 4- Se transfirieron 150 uL de la mezcla del pozo A1 a la mezcla del pozo B1. Se mezcló pipeteando suavemente 3 veces.
- 5- Se transfirieron 150 uL de la mezcla del pozo B1 al pozo C1 y se mezcló pipeteando suavemente 3 veces. Se repitió esta operación hasta el pozo G1.

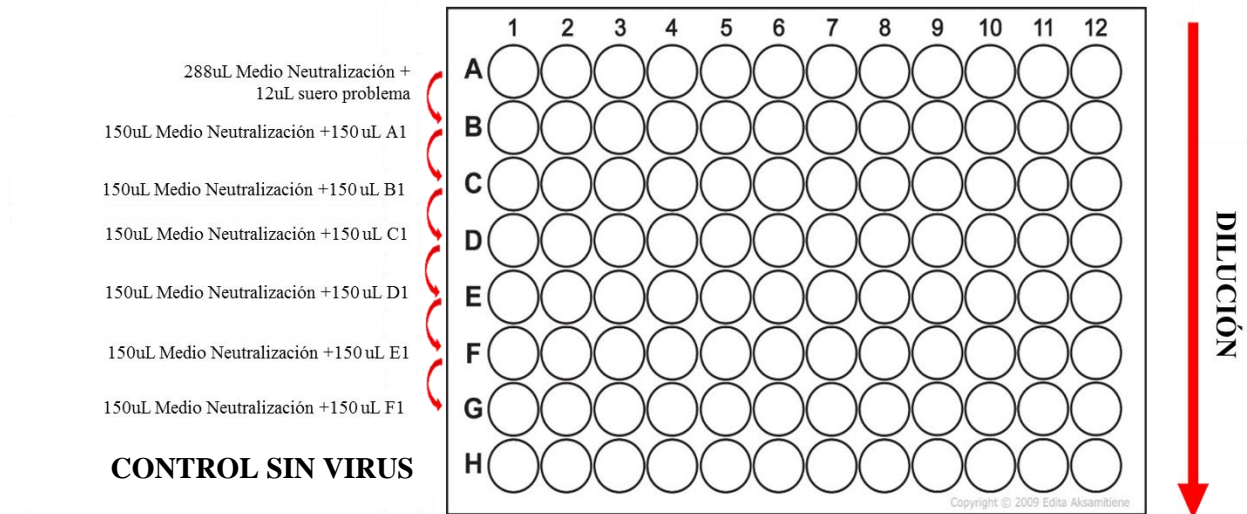


Figura 3. Preparación de la placa de suero.

- 6- Se preparó la mezcla de vector viral en medio de neutralización. Se utilizó un MOI de 20K para AAV9, 12,5K para AAV1 y 5K para AAV2.
 - a. Para preparar el stock de virus AAV1 se tomaron 5,6 uL de virus a concentración 1×10^{13} vg/mL, diluyéndolos en un total de 5 mL

- b. Para preparar el stock de virus AAV2 se tomaron 2,25 uL de virus a concentración 1×10^{13} vg/mL, diluyéndolos en un total de 5 mL
 - c. Para preparar el stock de virus AAV9 se tomaron 9 uL de virus a concentración 1×10^{13} vg/mL, diluyéndolos en un total de 5 mL
- 7- Se transfirieron 150 uL de la mezcla de vector con 150 uL de la mezcla de los sueros, teniendo cuidado de no añadir virus en la última columna (G1).
- 8- En una columna aparte se realizaron realizar diluciones seriadas del stock de virus con MOI de la siguiente manera:
- Para curva de calibración sola:
- a. En un pozo se añadieron 120 uL de stock de virus+ 120 uL de medio de neutralización.
 - b. En el siguiente pozo se añadieron 60 uL de stock de virus + 180 uL de medio de neutralización
 - c. En el siguiente pozo se añadieron 30 uL de stock de virus + 210 uL de medio de neutralización + 120 uL de control negativo
 - d. En el último pozo se añadieron 240 uL de medio de neutralización.
- Para curva de calibración con control negativo:
- a. En un pozo se añadieron 120 uL de stock de virus+ 120 uL de control negativo
 - b. En el siguiente pozo se añadieron 60 uL de stock de virus + 60 uL de medio de neutralización + 120 uL de control negativo
 - c. En el siguiente pozo se añadieron 30 uL de stock de virus + 90 uL de medio de neutralización + 120 uL de control negativo
 - d. En el último pozo se añadieron 120 uL de medio de neutralización + 120 uL de control negativo.
 - e. Se transfirió placa de suero en la incubadora durante 1 hora a 37 °C con 5% de CO₂.

3.1.2.2 Transferencia de la mezcla de suero a la placa de células.

- 1- Se colocó la placa de suero y la placa de células en cabina estéril
- 2- La placa de células fue lavada 3 veces con medio de neutralización. Para minimizar el daño celular no se transfirió el medio directamente a las células, sino el contenido de la pipeta debe se soltó en las paredes del pozo y se dejó caer con suavidad.
 - a- Para el AAV9 fue necesario un tratamiento con Neuraminidasa tipo III, 5 mEq/Pozo durante 2 horas. Se añadieron 100uL de solución de Neuraminidasa diluida en medio de neutralización en cada pozo y se dejó en incubadora durante 2 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se realizó un lavado con medio de neutralización 3 veces, y un tratamiento de shock térmico (4°C- 1h). Se continuó con el punto 3.
- 3- Se transfirieron 200 uL de cada pozo de la columna 1 de la placa de suero a la columna 3 de la placa de células. Para minimizar el daño celular no se transfirió el medio directamente a las células, sino el contenido de la pipeta debe se soltó en las paredes del pozo y se dejó caer con suavidad. Se repitió el procedimiento para las columnas 4 y 5 de la placa de células.
- 4- Se transfirió la placa de células a la incubadora y se dejó incubar a 37 °C con 5% de CO₂ durante 1 día.

Para cada placa fue necesario sembrar en las primeras líneas la curva estándar que se realizó con las diluciones seriadas del stock viral. Esto para tener un control positivo de infección y correlacionar los resultados con la disminución en la entrada de las partículas virales a la célula.

3.1.2 Día 3: Determinación de actividad de gen reportero.

3.1.3 La actividad del gen reportero (Fluorescencia) se cuantificó mediante el lector de microplacas Synergy 2™. Imágenes de los pozos significativos fueron tomadas mediante el sistema de microscopia InCell 6000™.

3.1.4 Día 4: Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes.

Para el cálculo del porcentaje de expresión de gen reportero (PE) y el porcentaje de inhibición de gen reportero (PI) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{PE} = [(\text{Expresión en muestra} - \text{Expresión en pozo sin vector}) / (\text{Expresión en pozo sin suero} - \text{Expresión en pozo sin vector})] \times 100$$

$$\text{PI} = 100 - \text{PE}$$

El título de NAb de la muestra se reportó como la primera dilución a la cual el 50% de porcentaje de inhibición es detectado. Casos con un Título neutralizante $\geq 1:50$ fueron considerados positivos, según las recomendaciones de la *Food and Drug Agency* (FDA) para estudios con AAV (FDA, 2015).

3.2 Aspectos éticos

Esta investigación cumplió con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki, última versión Fortaleza, octubre de 2013 de la Asociación Médica Mundial, el informe Belmont y las directrices establecidas por la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993. La investigación fue realizada bajo el respeto a la dignidad y protección de los derechos de los participantes y los

principios morales de la comunidad a que pertenecen. Los sujetos incluidos en el estudio se les tomó una muestra de sangre por punción antecubital por personal capacitado y entrenado, con un volumen máximo de toma de 20 mL, con material nuevo y estéril clasificando así esta investigación como de riesgo mínimo según el artículo 11 de la resolución N° 008430. Previa a la toma, los consentimientos informados fueron firmados de acuerdo con la regulación nacional, autorizando la toma y utilización de la muestra para la realización del estudio ANVIAS (estudio anidado) y estudios posteriores en la misma temática del actual. Este consentimiento informado, al igual que el formato de recolección de datos fueron avalados por el comité de ética de la Fundación Cardiovascular de Colombia mediante el acta 406 del 13 de septiembre de 2016. El presente proyecto fue avalado por el comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander, CEINCI.

El estudio no produjo ninguna alteración del medio ambiente o la salud humana a corto, mediano o largo plazo. Todos los métodos y procedimientos implementados durante este estudio contaron con el respaldo de la Fundación Cardiovascular de Colombia, entidad reconocida por la calidad de la prestación de sus servicios (certificación Norma ISO 9001:2000, ICONTEC) y de su Dirección de Investigaciones, el cual ha sido certificado para el diseño, elaboración y desarrollo de proyectos de investigación básica, clínica, epidemiológica y administrativa

3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de todas las mediciones de variables continuas documentadas en las determinaciones que se realizaron en muestras de suero, fueron descritos utilizando medidas de tendencia central como medias, así como conteos y proporciones para las variables discretas con

sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Para las pruebas entre grupos de estudio se empleó la prueba de chi cuadrado para diferencias entre proporciones. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas asociadas a un valor de $p < 0,05$. Para la selección de variables en la regresión logística binomial y multinomial se utilizó el método StepwiseAIC. La selección del modelo se hizo utilizando el criterio de información de Akaike. Se utilizó el Software estadístico R versión 3.3.3.

4. Resultados

4.1 Estandarización de la técnica de determinación de anticuerpos neutralizantes *in vitro*

Debido a la gran heterogeneidad que existe entre la metodología de los estudios previos, se utilizó una versión modificada del protocolo publicado por Jungmann & Rapti (2017) adaptada según las recomendaciones del laboratorio de terapia génica del Nationwide Children's Hospital en Columbus, Ohio. La línea celular y el gen reportero fueron escogidos según las recomendaciones de los protocolos en la literatura (Jungmann & Rapti, 2017; Meliani *et al.*, 2015).

Para determinar el MOI de cada serotipo de AAV se realizó una curva de calibración con MOI seriados, midiendo la actividad del gen reportero (GFP). Posteriormente se realizaron curvas de dilución con los MOI que mostraban mejor correlación y se realizó una regresión lineal con los resultados de GFP. Se escogieron los MOI con R^2 en regresión lineal más cercana a 1, lo cual indica una mayor correlación entre la señal de GFP y la disminución de la entrada de los virus. (Figuras 5 y 6). Las curvas de calibración eran incluidas en cada ensayo adicional, junto a un control negativo (suero humano) el cual fue proporcionado por el laboratorio de terapia génica del Nationwide Children's Hospital.

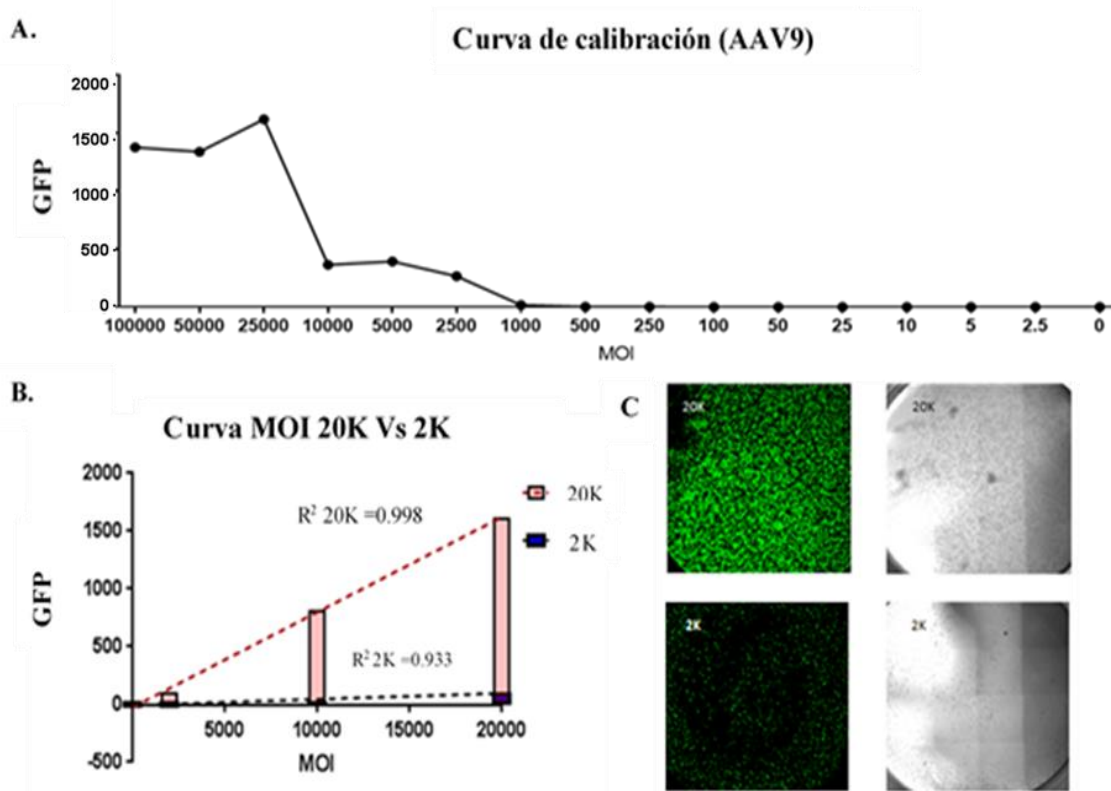


Figura 4. Curvas de calibración para determinación del MOI en el serotipo AAV9. Una primera curva de calibración sin suero fue realizada para el serotipo AAV9 (A). Dos MOI promisorios (20K y 2K), con mayor relación lineal en la primera curva de calibración fueron evaluados con curvas de dilución seriadas. El MOI de 20k mostró un mejor coeficiente de determinación en la regresión lineal (B) y mayor intensidad de lectura con el equipo (C). (Las imágenes corresponden a un pozo representativo del ensayo).

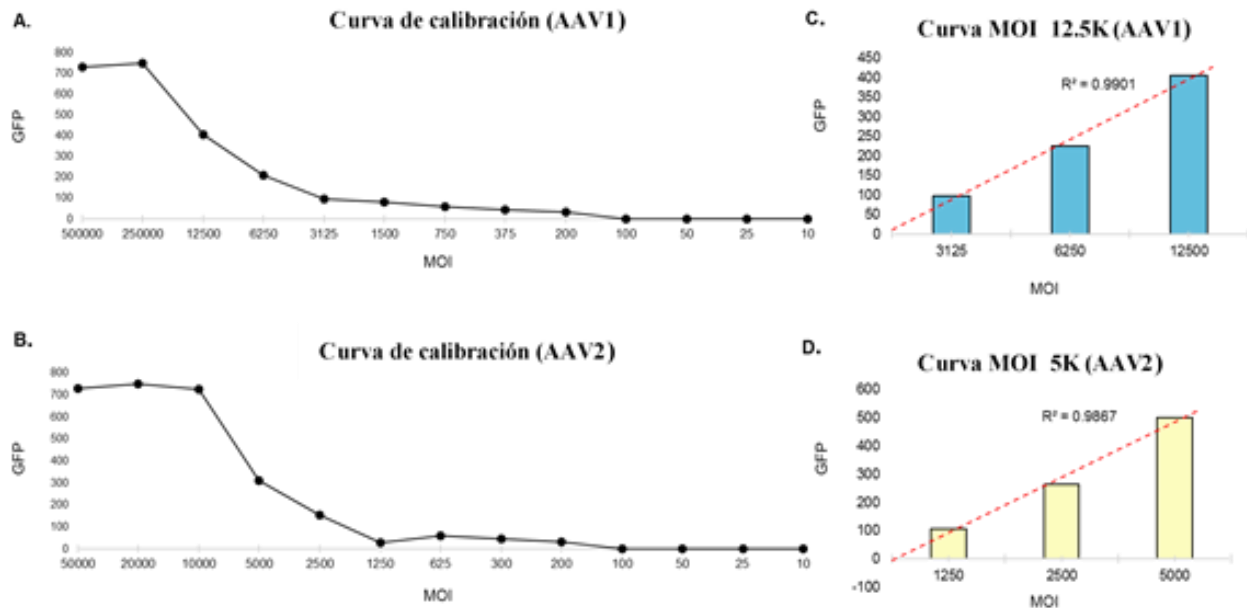


Figura 5. Curvas de calibración para determinación del MOI en los serotipos AAV1 y AAV2. Se realizaron curvas de calibración, sin suero, para el serotipo AAV1 y AAV2 (A y B, respectivamente). Los MOI de 12,5K (C) y 5K (D) mostraron mejor correlación lineal para los serotipos evaluados.

Debido a la baja infectividad del AAV9 *in vitro*, se incorporó al protocolo un tratamiento a las células con neuraminidasa, el cual no se consideraba en el protocolo inicial de Jungmann & Rapti (2017). El AAV9 tiene como receptor primario, además del AAVR un residuo N-Galactosa (Summerfold & Samulski, 2016), cuya función se ve deteriorada por altos residuos de ácido siálico (Zhu *et. al.*, 2018). La neuraminidasa rompe los enlaces entre la galactosa y el ácido siálico, permitiendo una mejor entrada del AAV9 a la célula (Zhu *et. al.*, 2018). Se puede observar que, sin el tratamiento de neuraminidasa, el AAV9 no es infectivo y por tanto no es posible determinar el título de NAb en una muestra con título previamente determinado (Muestra

proporcionada por el laboratorio de terapia génica del Nationwide Children's Hospital) (Figura 7).

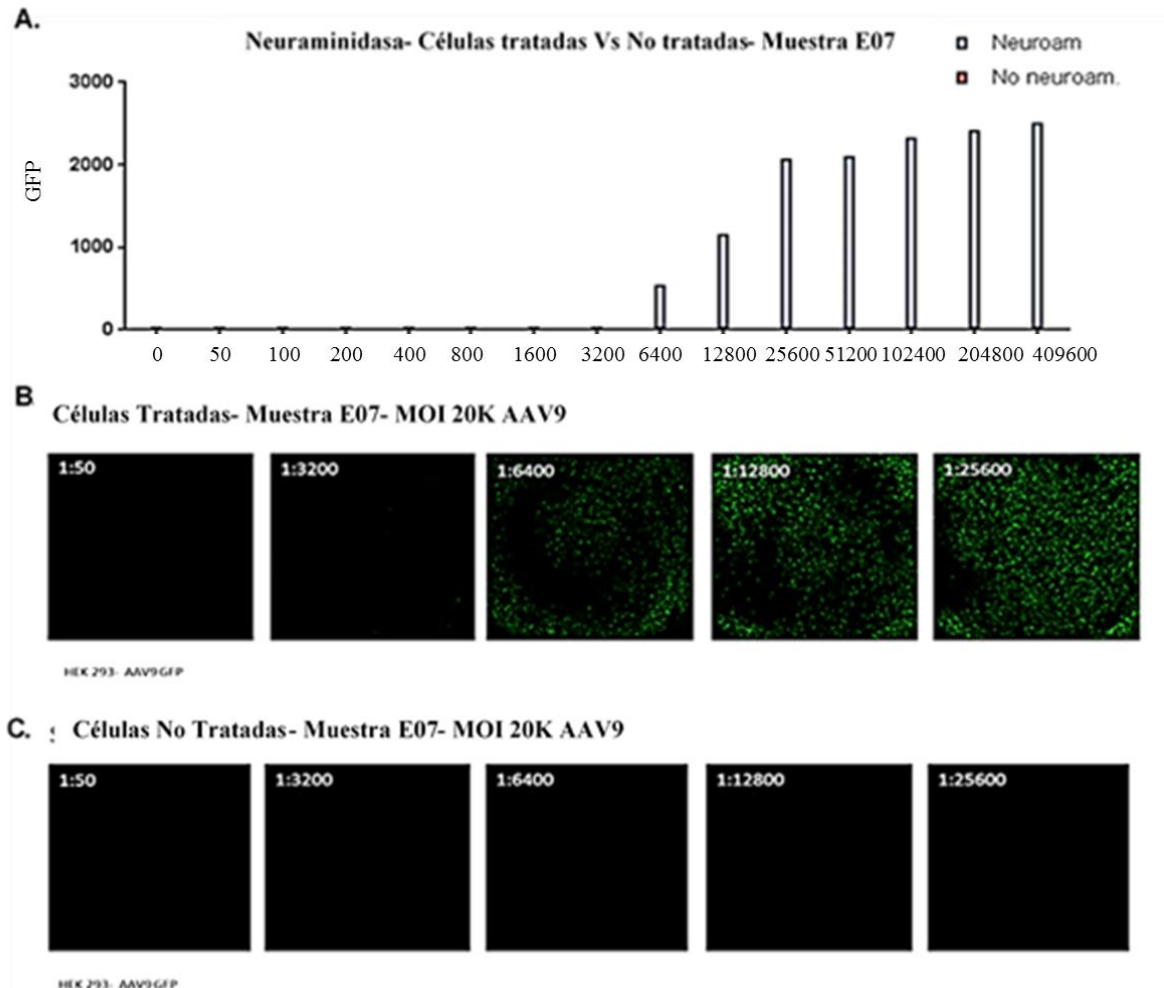


Figura 6. Efecto del tratamiento con neuraminidasa en ensayo de neutralización de una muestra con título previamente conocido **A.** Niveles de GFP en células tratadas vs no tratadas con neuraminidasa en un ensayo con muestra conocida de NAb anti AAV9 (1:6400). La muestra de suero conocido fue proporcionada por laboratorio de terapia génica del Nationwide Children's Hospital. **B-C.** Imágenes representativas del ensayo para células tratadas y no tratadas.

4.2 Características sociodemográficas de la muestra

4.2.1 Características sociodemográficas del grupo casos.

60 casos con diagnóstico de FC provenientes de consulta externa de la FCV fueron evaluados. Los casos presentan una distribución por sexo de hombres 76,6% (46) y 24,4% (14) de mujeres. La edad de los casos presenta desviación a la derecha, con un rango que varía desde los 20 hasta los 87 años, y una media de 60,4 años (DE $\pm 14,1$) (Tabla 4). El 91,6% (55) de los casos se reconocen como mestizos, el 6,6% (4) se reconocen como afrodescendientes y el 1,6% (1), como caucásicos. Los casos provienen en su mayoría del departamento de Santander (48,3% (29)), seguido por Norte de Santander (13,3 % (8)) y Bolívar (8,3% (5)), con representación de la mayoría del área andina y costa caribe (Figura 7). La mayoría de los casos (83%) reportaron acceso a educación superior (Tabla 5). Más del 80% de los participantes del grupo casos cuentan con servicio público de alcantarillado, acueducto, servicio sanitario y recolección de basuras. (Figura 8).

Tabla 4.

Principales características sociodemográficas del grupo casos

	Hombres	Mujeres	Total
Prevalencia	46 (76,6%)	14 (24,4%)	60 (100%)
Edad (Años)- Media	61,33 (Rango 22-85 DE:14)	57,87 (Rango 20-80 DE:18,13)	60,4 (Rango 20-85 DE:14,1)
FEVI (%) - Media	32,11 (Rango 8-65 DE:15,38)	37,1 (Rango 15-58 DE:15,7)	33,34 (Rango 8-65 DE:15,48)
Origen (Rural/ Urbano)	27 (58,1%) / 19 (41,9%)	8 (57,1%) / 6 (42,9%)	36(57,9%) / 24 (42,1%)
Procedencia (Rural/ Urbana)	10(21,3%) / 36(78,7%)	4(28,6%) / 10(71,4%)	14(23%) /46(77%)
Seguridad social (Régimen contributivo/Subsidiado)	32(69,5%) / 14(30,5%)	9 (64,3%) / 5(35,5%)	41(68,3%) / 19(31,7%)
Acceso a educación superior (Si/No)	39(84,7%) / 7(15,3%)	11(78,5%) / 3(21,4%)	50(83,3%) / 10(16,7%)
Viaje en el último año (Si/No)	26(56,5%) / 20(43,4%)	3 (21,4%) / 11(78,6%)	29 (48,3%) / 51(51,7%)
Cambio de domicilio en el último año (Si/No)	8 (17,4%) / 38(82,6%)	1(7,1%) / 10(92,9%)	9 (15%) / 51(85%)

Nota: FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo. DE: Desviación Estándar.

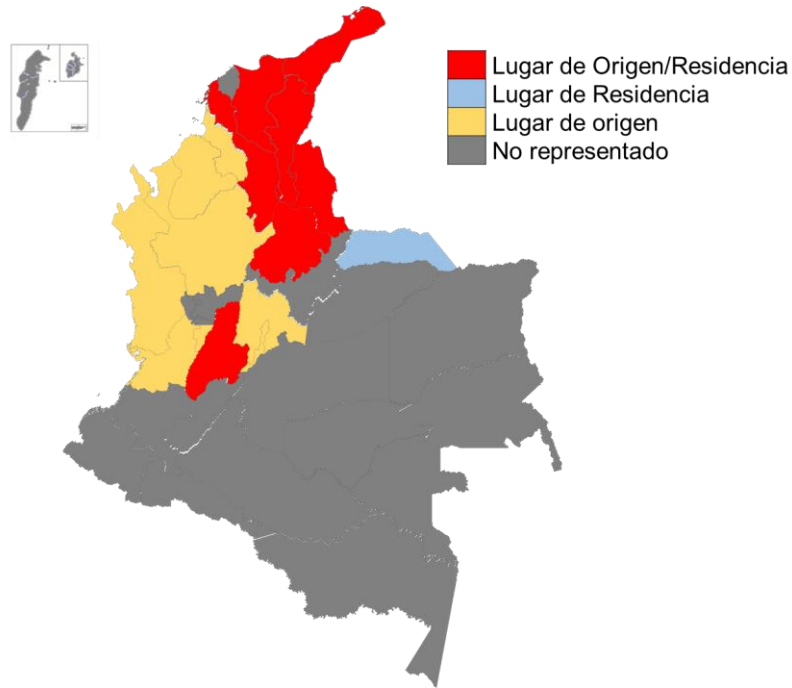


Figura 7. Localización geográfica de origen/ procedencia el grupo casos

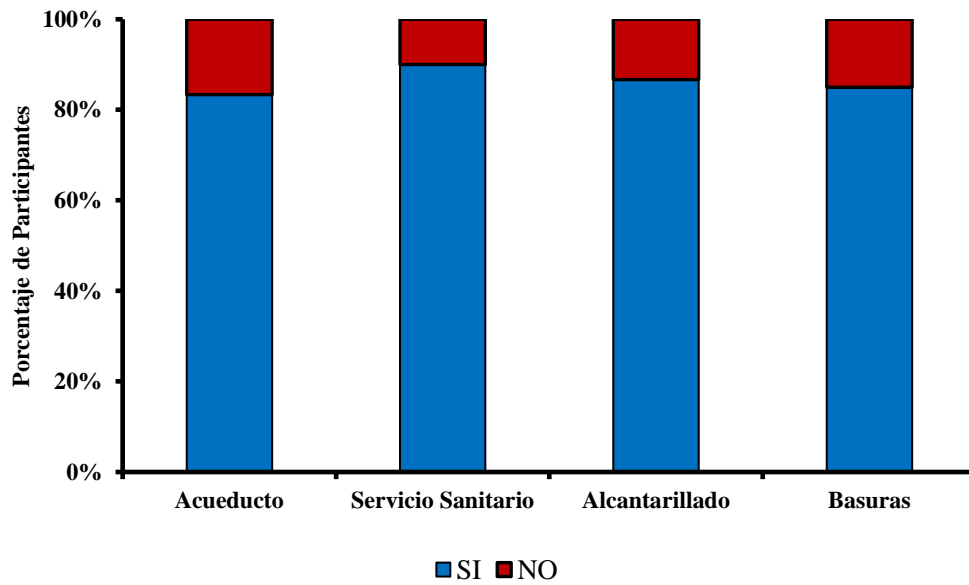


Figura 8. Acceso a servicios públicos en el grupo casos

Actualmente el 97,5% de los participantes del grupo casos (58) se encuentran en una etapa sintomática de la enfermedad, presentando falla estadio C o superior, con 15% de casos refractarios al tratamiento (Estadio D) (Figura 9). Respecto a la fracción de eyección, los valores varían en un rango de 8 hasta 60%, con una mediana de 30 y media de 33,34% (Tabla 4). El 50% (30) de los participantes del grupo casos tiene una fracción de eyección entre 18 y 45% (fracción no recuperada). Las comorbilidades más frecuentes entre los casos son en su orden hipertensión arterial (HTA), sobrepeso/obesidad e infarto agudo de miocardio (IAM) (Tabla 5). El 76,7% de los casos (46) tienen antecedente de cirugía previa, el 26,7% (16) reportó exposición a tóxicos y 21,7 % (13) antecedentes de transfusión sanguínea o de hemoderivados (Tabla 5). La mayoría de los participantes del grupo casos manifestó tener hábitos de vida saludable, eran activos físicamente (71,6% (43)) y no refirieron historia previa de tabaquismo (55% (33)) o consumo actual de alcohol (88,3% (53)).

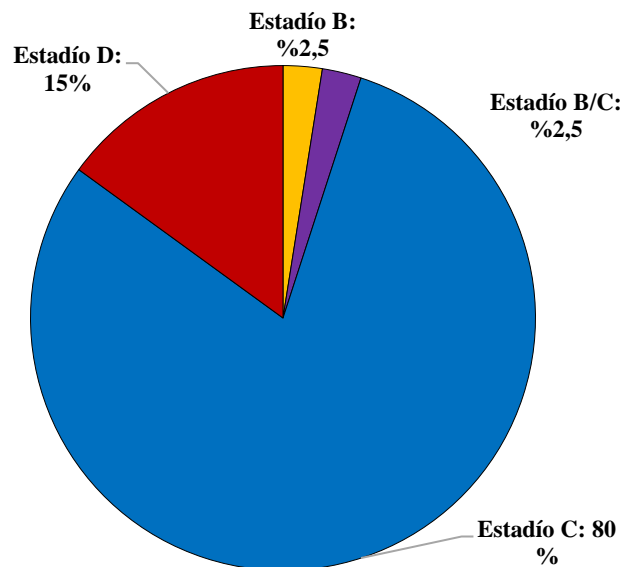


Figura 9. Estadio de falla cardíaca de los participantes del grupo casos al momento de la toma de muestra según criterios AHA.

Tabla 5.

Comorbilidades y otros antecedentes de los participantes del grupo casos

Comorbilidades	Presenta (n (Porcentaje))	No presenta (n (Porcentaje))
HTA	35 (58,3%)	25(41,7%)
Sobrepeso/Obesidad	29(48,3%)	31(51,7%)
IAM	26 (43,3%)	34 (56,7%)
Dislipidemia	21 (35%)	39(65%)
Enfermedad Renal	16 (26,6%)	44(74,4%)
Diabetes Mellitus	12 (20%)	48 (80%)
Antecedentes Quirúrgicos	46 (76,7%)	14(23,3%)
Antecedentes Traumáticos	18 (30%)	42 (70%)
Antecedentes Toxicológicos	16 (26,7%)	44 (76,3%)
Antecedentes Alérgicos	11 (18,3%)	49 (81,7%)
Transfusiones previas	13(21,7%)	47(78,3%)

Nota: HTA: Hipertensión arterial, IAM: Infarto agudo de miocardio

4.2.2 Características sociodemográficas de los participantes del grupo control.

Se tomaron 60 controles que cumplieran criterios de inclusión, pero que, a la fecha no hubiesen presentado diagnóstico de falla cardíaca. Los participantes del grupo control fueron localizados por medio de búsqueda activa en la comunidad, pareados según edad y sexo con los participantes del grupo casos. El 100% (60) de los participantes del grupo control se reconocen como mestizos. La distribución en sexo sigue el comportamiento de los casos, con 75% (46) de hombres versus 25% de mujeres (14). La edad de los participantes del grupo control tiene una media de 59,43 ($\pm 13,79$) (Tabla 6). La mayoría tienen su origen en Santander (81,6% (49)), Boyacá (3,33 % (2))

y Valle (3,33 % (2)), con una menor representación de la costa caribe en comparación a los casos (Figura 10). Todos los participantes del grupo control actualmente residen en área urbana de Santander (Tabla 6) y cuentan con servicio público de acueducto, alcantarillado, recolección de basuras y servicio sanitario.

Tabla 6.

Principales características sociodemográficas de los participantes del grupo control.

	Hombres	Mujeres	Total
Prevalencia	46 (76,6%)	14 (24,4%)	60 (100%)
Edad (Años)	60,54 (Rango 21-79 DE:12,55)	55,78 (Rango 20-79 DE:17,29)	60,4 (Rango 20-79 DE:13,79)
Origen (Rural/ Urbano)	26 (56,52%) / 20 (43,47%)	4 (28,57%) / 10 (71,42%)	30(50%) / 30 (50%)
Seguridad social (Régimen contributivo/Subsidiado)	38(82,6%) / 8(17,4%)	4(28,6%) / 10(71,4%)	42(70%) / 18(30%)
Acceso a educación superior (Si/No)	30(65,2%) / 16(34,8%)	8(57,1%) / 6(42,9%)	38(63,3%) / 22(36,7%)
Viaje en el último año (Si/No)	15(32,6%) / 31(67,4%)	9 (64,3%) / 5(35,7%)	24 (40%) / 36(60%)
Cambio de domicilio en el último año (Si/No)	10 (21,7%) / 36(78,3%)	8(57,11%) / 6(42,9%)	18(30%) / 42(70%)

Nota: DE: Desviación Estándar.

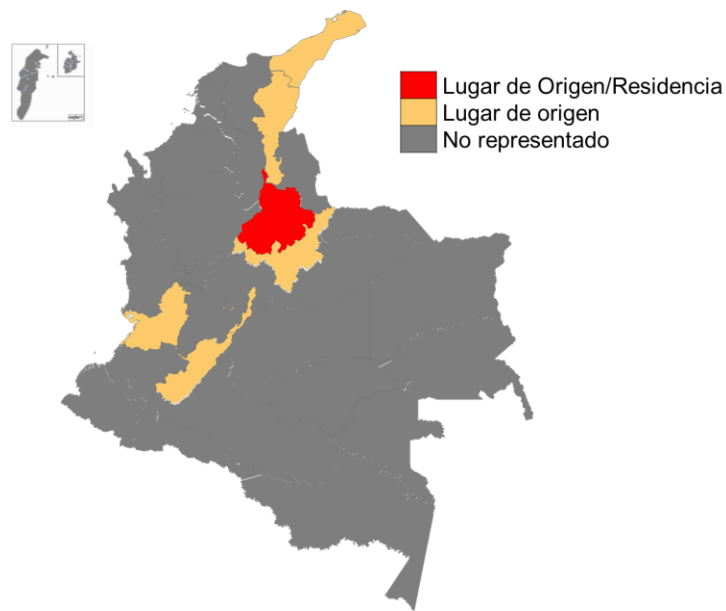


Figura 10. Procedencia geográfica de los participantes del grupo control. Se observa una menor diversidad geográfica en el grupo control comparados con los casos debido a que la mayor parte del grupo control tiene su lugar de origen y procedencia en Santander.

A diferencia de los casos con FC, las comorbilidades más frecuentes entre los participantes del grupo control son en su orden sobrepeso/obesidad, HTA y Diabetes Mellitus (Tabla 7). El 5% de los controles (3) tienen antecedentes de transfusión sanguínea o de hemoderivados, el 35% (21) reportó exposición a tóxicos y 63,3% (38) antecedente de cirugía previa (Tabla 7). La mayoría de los participantes del grupo control manifestó tener hábitos de vida saludable, refiriendo actividad física (70% (42)), sin historia previa de tabaquismo (53,3% (32)) o consumo actual de alcohol (50% (30)).

Tabla 7.

Comorbilidades y otros antecedentes en los participantes del grupo control.

Comorbilidades	Presenta (n (Porcentaje))	No presenta (n (Porcentaje))
Sobrepeso/Obesidad	37(61,7%)	23 (38,3%)
HTA	24 (40%)	36 (60%)
Diabetes Mellitus	9 (15%)	51 (85%)
Dislipidemia	8(13,3%)	52 (86,7%)
Enfermedad renal	5 (8,3%)	55 (91,7%)
IAM	2 (3,3%)	58 (96,7%)
Enfermedad Autoinmune	2 (3,3%)	58 (96,7%)
Antecedentes Quirúrgicos	38(63,3%)	22(36,7%)
Antecedentes Traumáticos	12 (20%)	48(80%)
Antecedentes Toxicológicos	21(35%)	39 (65%)
Antecedentes Alérgicos	8 (13,3%)	52 (86,7%)
Transfusiones previas	3(5%)	57(95%)

Nota: HTA: Hipertensión arterial, IAM: Infarto agudo de miocardio

4.3 Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados, serotipos AAV1, AAV2 y AAV9

Se evaluaron las muestras de los 60 participantes del grupo casos y 60 del grupo control para NAb utilizando el protocolo de neutralización *in vitro* según la metodología expuesta anteriormente. El título de NAb de la muestra se reportó como la primera dilución a la cual el

50% de porcentaje de inhibición es detectado. Muestras con un título neutralizante $\geq 1:50$ fueron consideradas positivas. En total 53,3% (32) de los casos y 63,3% (38) de los participantes del grupo control (Figura 11) fueron positivos para al menos uno de los tres serotipos evaluados. No existe diferencia significativa entre los niveles de NAb para al menos un serotipo entre los participantes del grupo casos y los participantes del grupo control (p: 0,3545).

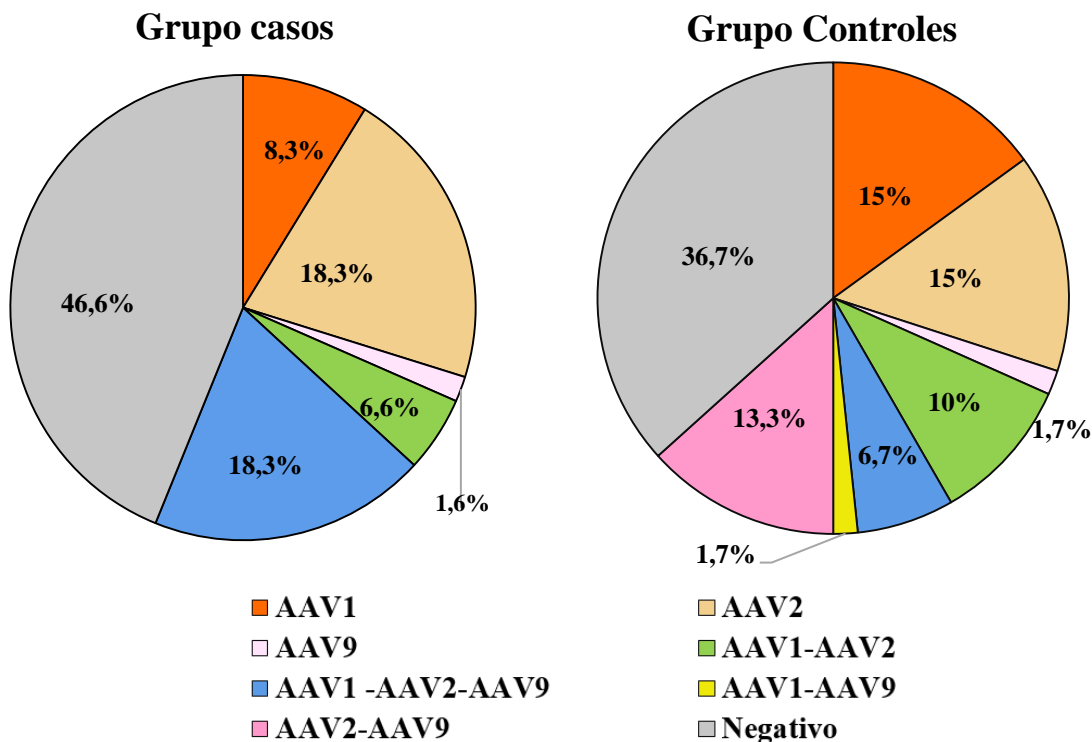


Figura 11. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 en participantes del grupo casos y el grupo controles.

4.3.1 AAV Serotipo 1.

El 33,3% de los casos (20) fueron positivos para AAV1. La mayor parte de los casos positivos para AAV1 (75%) mostraron reacción cruzada para AAV2 (Tabla 10). Respecto a los títulos de

anticuerpos, 60% (12) de las muestras tienen títulos en diluciones de 1:800 o mayores. Ningún caso positivo para AAV1 presentó títulos bajos de NAb (1:50) (Figura 12).

Al igual que en los casos, un 33,3% de los participantes del grupo control (20) fueron positivos para AAV1, razón por la cual no existe diferencia en la prevalencia de NAb en AAV1 entre los 2 grupos ($p:1$). A pesar de que la mayor parte de las muestras positivas para AAV1 (55%) también muestran reacción cruzada para AAV2 y AAV9 (Tabla 8), este porcentaje es menor al visto en los casos. Respecto a los títulos de anticuerpos, el comportamiento de los participantes del grupo control sigue el mismo de los casos, debido a que el 57,7% (12) de los participantes del grupo control positivos presentan títulos en diluciones de 1:800 o mayores (Figura 12).

Tabla 8.

Porcentaje de muestras NAb- anti AAV1 positivas con reacción cruzada con AAV2 o 9 en participantes del grupo casos y el grupo control.

	Casos (Total positivos)	Controles (Total positivos)
AAV1 (Sólo)	5 (25%)	9 (45%)
AAV1-AAV2	4 (20%)	6 (30%)
AAV1-AAV9	0 (0%)	1 (5%)
AAV1 -AAV2-AAV9	11 (55%)	4 (20%)
AAV1(Total)	20 (100%)	20 (100%)

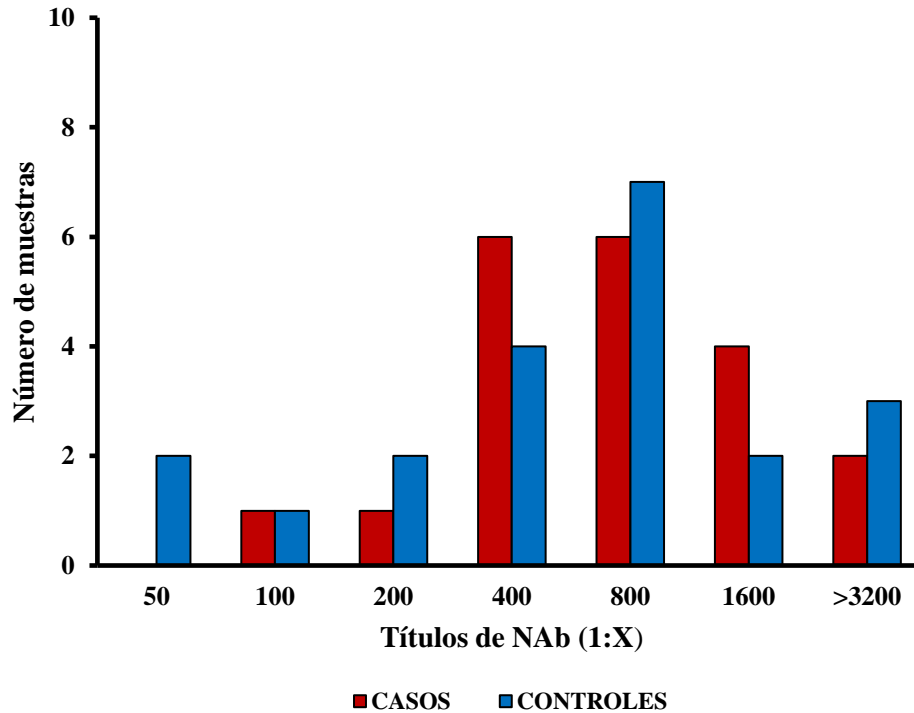


Figura 12. Títulos de NAb anti- AAV1 en participantes del grupo casos y grupo control

4.3.2 AAV Serotipo 2.

En total, 43,3% de los casos (26) fueron positivos para AAV2. La mayor parte de las muestras positivas para AAV1 (57%) mostraron reacción cruzada para AAV2 (Tabla 12). Respecto a los títulos de anticuerpos, 66,6% (18) de las muestras tienen títulos en diluciones de 1:800 o mayores. (Figura 13).

Respecto al grupo control, se encontró que 45% de los participantes del grupo control (27) fueron positivos para AAV2. Al realizar la prueba del chi cuadrado, podemos observar que no existe diferencia en la prevalencia de NAb en AAV2 entre el grupo casos y grupo control ($p:1$). A comparación de los casos, los participantes del grupo control presentan menor porcentaje de muestras con reactividad cruzada para otros serotipos (57,7% en grupo casos y 45,5% en Grupo control) (Tabla 9). Respecto a los títulos de anticuerpos, el comportamiento de los participantes

del grupo control es diferente al de los casos, dado que menos la mitad de las muestras tienen títulos mayores a 1:800 (48,1% (13) en grupo control y 66,6% (18) en grupo casos) (Figura 13).

Tabla 9.

Porcentaje de muestras NAb anti AAV2 positivas con reacción cruzada con AAV1 o AAV9 en el grupo casos y el grupo control.

	Casos (Total positivos)	Controles (Total positivos)
AAV2 (Sólo)	11 (42,3%)	15 (55,5%)
AAV1-AAV2	4 (15,3%)	6 (22,2%)
AAV2-AAV9	0 (0%)	8 (29,6%)
AAV1 -AAV2-AAV9	11 (42,3%)	4 (14,8%)
AAV2(Total)	26 (100%)	27(100%)

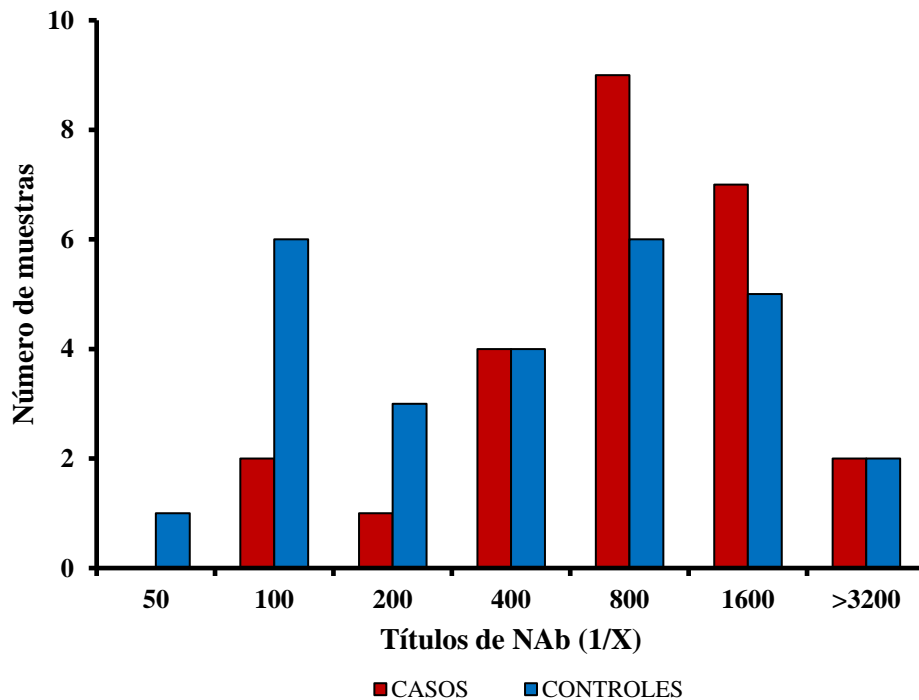


Figura 13. Títulos de NAb anti- AAV2 en participantes del grupo casos y grupo control

4.3.3 AAV Serotipo 9.

El 20% de los casos (12) fueron positivos para AAV9. Todas las muestras positivas para AAV9, con excepción de una, fueron también positivas para AAV1 y AAV2 (Tabla 10). Respecto a los títulos de anticuerpos, más del 90% de las muestras tienen títulos en diluciones menores a 1:800, siendo el 50% títulos de 1:50 (Figura 14). Se destaca que el caso positivo sólo para AAV9 muestra un título de 1:800.

El 23,33% de los participantes del grupo control (14) fueron positivos para AAV9. No existe diferencia significativa en la prevalencia de NAb en AAV9 entre el grupo casos y grupo control (P:0,82). Los participantes del grupo control presentan igual porcentaje de muestras con reactividad cruzada para otros serotipos que los del grupo casos, sin embargo, la distribución de la reactividad cruzada es diferente (Tabla 10). En el grupo casos, todas las muestras con reactividad cruzada son positivas para los serotipos AAV1 y AAV2, mientras que en el grupo control apenas un 28,6% de las muestras son positivas para los tres serotipos. Respecto a los títulos de anticuerpos, el comportamiento de los participantes del grupo control no difiere del presentado por los participantes del grupo casos (Figura 14). Se resalta que ni el grupo casos, ni control presentan títulos de NAb superiores a 1:800.

Tabla 10. *Porcentaje de muestras NAb- anti-AAV9 positivas con reacción cruzada con AAV1 o AAV2 en grupo casos y en grupo control.*

	Casos (Total positivos)	Controles (Total positivos)
AAV9 (Sólo)	1 (8,3%)	1 (7,1%)
AAV1-AAV9	0 (0%)	1 (7,1%)
AAV2-AAV9	0 (0%)	8 (57,2%)
AAV1 -AAV2-AAV9	11 (91,6%)	4 (28,6%)
AAV9(Total)	12 (100%)	14(100%)

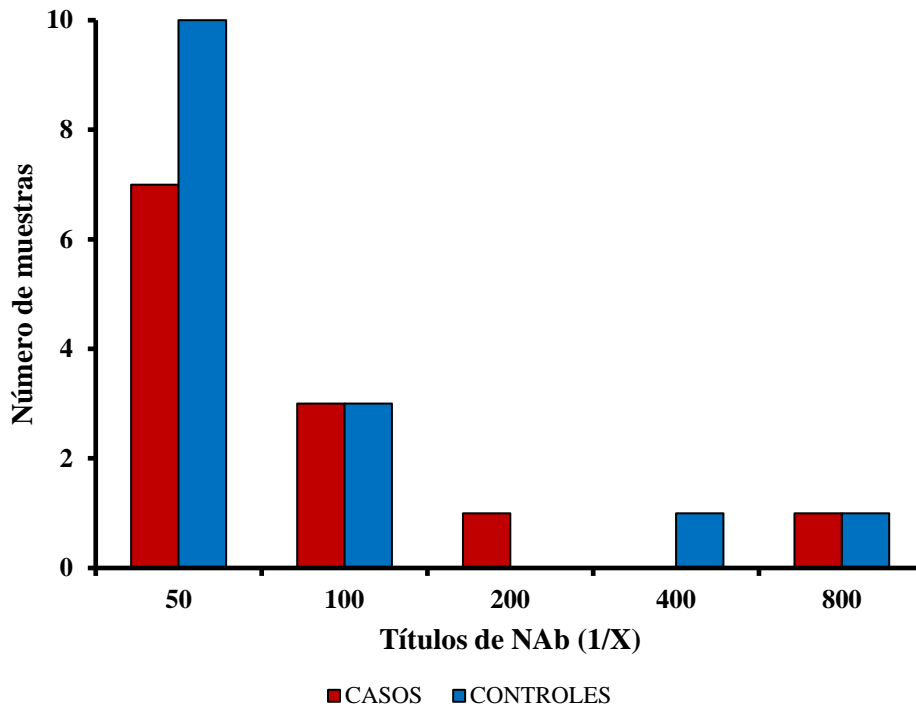


Figura 14. Títulos de NAb anti- AAV9 en participantes del grupo casos y grupo control

4.4 Prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados serotipos AAV1, AAV2 y AAV9

El 24,9% de los participantes del grupo casos presentan prevalencia combinada de NAb contra 2 o más serotipos (Figura 11). De igual manera el 44% (14) de las muestras positivas para al menos un serotipo presentan reactividad cruzada, siendo más de un tercio de estas positivas para los tres serotipos. (Figura 15). De manera interesante ningún caso presentó seropositividad para AAV1-AAV9 ni AAV2-AAV9 de manera exclusiva.

En el grupo control, el 31,7% de los participantes presentan prevalencia combinada de NAb contra 2 o más serotipos (Figura 11). De igual manera el 50% (19) de las muestras positivas para

al menos un serotipo presentan prevalencia combinada (Figura 15). No existe diferencia significativa en el número de muestras con prevalencia combinada entre grupo casos y grupo control ($p:0,68$). De manera interesante, a diferencia de los casos, los participantes del grupo control tienen una menor proporción de muestras positivas para los 3 serotipos (10%) y presentan muestras con seropositividad para AAV1-AAV9 (3%) y AAV2-AAV9 (21%) de manera exclusiva

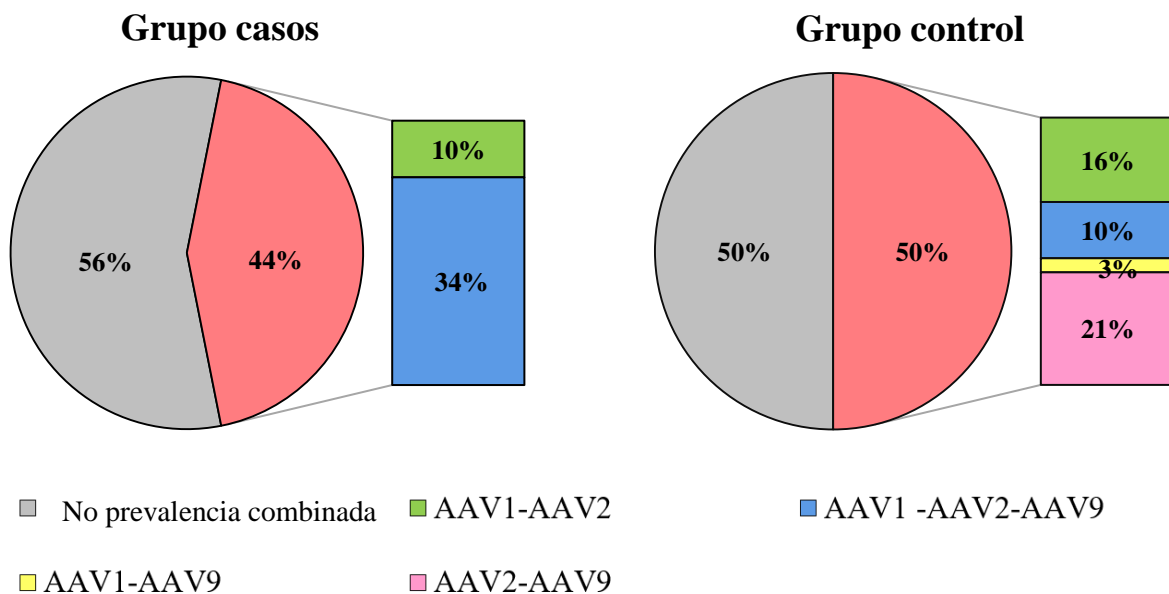


Figura 15. Prevalencia combinada en muestras positivas del grupo casos y grupo control.

4.5 Incidencia de factores socioeconómicos en la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales adenoasociados, serotipos AAV1, AAV2 y AAV9

4.5.1 Incidencia de factores socioeconómicos en prevalencia total de anticuerpos neutralizantes.

Para dilucidar el impacto de los factores socioeconómicos en la prevalencia de NAb anti AAV se realizó en un primer lugar un test de chi cuadrado utilizando como variables independientes la edad y el sexo, las cuales son las dos principales variables asociadas en la literatura con presencia de NAb. En los casos, no hay diferencias estadísticamente significativas ni entre la presencia de NAb y las variables sexo ($p:0,71$), o edad ($p: 0,37$). De igual manera no se encontró asociación de edad o sexo con NAb en los participantes del grupo control (Edad $p:0,37$, Sexo $p:0,74$).

Para evaluar el impacto de otros factores socioeconómicos y ver posibles interacciones entre las variables independientes se realizó una regresión logística binomial, teniendo como variable de salida la presencia de NAb para al menos uno de los serotipos. Las variables para el modelo se escogieron utilizando el método StepwiseAIC. El modelo final tuvo un área bajo la curva ROC de 0,849 (Figura 16) e incluye los siguientes factores: exposición a tóxicos, cirugía previa, acceso a agua potable, acceso a recolección de basuras, hospitalización previa y viaje en los últimos 12 meses. De estas variables sólo exposición a tóxicos y cirugía previa mostraron una asociación estadísticamente significativa (Tabla 11).

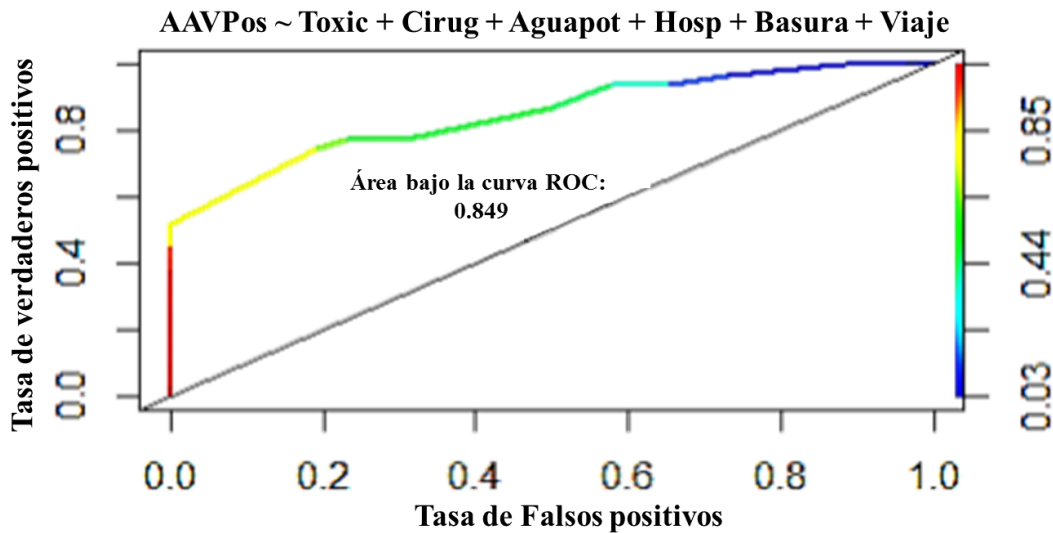


Figura 16. Curva ROC del modelo de regresión logística binomial. **AAVPos**: Presencia de NAb para al menos uno de los serotipos, **Toxic**: Antecedente de exposición a tóxicos, **Cirug**: Antecedente de cirugía previa, **Aguapot**: Acceso a agua potable, **Hosp**: Hospitalización previa, **Basura**: Acceso a recolección de basuras, **Viaje**: Antecedente de viaje en el último año.

Tabla 11.

Variables incluidas en el modelo de regresión logística binomial

	OR	IC (95%)	Valor p
Exposición a tóxicos	22,72	[20,42, 25.01]	0,007
Cirugía Previa	14,65	[12,59, 16,74]	0,01
Acceso a agua potable	6,00E-10	[3,4E-156, 4744]	0,99
Acceso a recolección de basuras	3,30E-09	[NA, 3,83E113]	0,99
Hospitalización previa	4,44	[2,89, 5,98]	0,05866
Viaje en los últimos 12 meses	0,29	[0,85, 15]	0,09313

Nota: **OR**: Odds Ratio, **IC**: Intervalo de confianza, **NA**: No aplicable

La calidad de ajuste del modelo de la regresión logística fue validada utilizando los estadísticos pseudo- R^2 de McFadden (0,3339) y el pseudo- R^2 de Cox-Snell (0,3733859). Para evaluar el ajuste global del modelo, se realizó la Prueba de Bondad de Hosmer-Lemeshow ($p:0,9188$). Todos los resultados indican que el modelo de regresión escogido presenta un buen ajuste, con buena calidad y es adecuado para la predicción de la presencia de NAb contra al menos un serotipo de los evaluados.

4.5.2 Incidencia de factores socioeconómicos en prevalencia combinada de anticuerpos neutralizantes contra serotipos AAV1, AAV2 y AAV9.

Para evaluar el impacto de factores socioeconómicos que pudieran influir en la prevalencia combinada de serotipos 1, 2 y 9 se realizó una regresión logística multinomial. Se utilizó como variable de salida la presencia de NAb la cual fue dividida en 3 categorías= “NINGUNO” para las muestras que no presentaban NAb “UNO” para las muestras que sólo presentaban NAb contra un serotipo y “MULTIPLE” para las muestras que presentaban NAb contra 2 o más serotipos. Se escogió la categoría NINGUNO como referencia para poder contrastar la presencia de NAb contra múltiples serotipos contra la de sólo un serotipo. Las variables para el modelo se escogieron utilizando el método StepwiseAIC. El modelo final incluyó las variables: exposición a tóxicos, alergias, hospitalización previa, acceso a alcantarillado, lugar de domicilio y acceso a agua potable.

Se realizó la validación estadística del modelo con una distribución chi-cuadrado, la cual fue significativa con una $p < 0,05$. Para realizar el ajuste global del modelo, se realizó el test de chi-cuadrado de la razón de verosimilitud, comparando el modelo ajustado con un modelo saturado. El valor del estadístico P en la razón de verosimilitud fue de 0,99. Esto, sumado al chi cuadrado

nos indica que el modelo es adecuado para el ajuste de los datos. La calidad ajuste del modelo de la regresión logística multinomial fue validado utilizando los estadísticos pseudo-R² de McFadden (0,140) y el pseudo-R² de Cox-Snell (0,262). Estos estadísticos indican una calidad de ajuste regular del modelo a los datos presentados.

Ninguna variable fue estadísticamente significativa en la categoría “MULTIPLE”, mientras que en la categoría “UNO” las variables con significancia fueron exposición a tóxicos y hospitalización previa, lo cual coincide con los resultados de la regresión logística binomial (Tabla 12).

Tabla 12.

Variables incluidas en el modelo de regresión logística multinomial

CATEGORÍA	Variable Independiente	OR	IC (95%)	Valor p
“UNO”: Positivo para sólo un serotipo evaluado	Exposición a tóxicos	2,97	[1,03,8,56]	0,001
	Alergia	3,05	[0,8 ,11,3]	0,43
	Hospitalización Previa	3,58	[0,8, 15,2]	0,001
	Acceso a alcantarillado	9,48E-10	[6,6E-122 1,35E+103]	0,24
	Lugar de domicilio	4,01E-20	[5,1E-33, 3,15E-07]	0,95
	Acceso a agua potable	3,33E-11	[1,78E-110, 6,22E88]	0,43
“MÚLTIPLE”: Positivo para múltiples serotipos evaluados	Exposición a tóxicos	0,55	[0,1, 1,54]	0,41
	Alergia	0,87	[0,2, 3]	0,41
	Hospitalización Previa	0,5	[0,07, 3,3]	0,12

Acceso a alcantarillado	2,93E-15	[6,27E-179 1,37E+149]	0,47
Lugar de domicilio	7,53E-21	[9,57E-34, 5,9E-08)	0,97
Acceso a agua potable	1,88E-05	[5,2E-182 6,7E+171]	0,95

Nota: **OR:** Odds Ratio, **IC:** Intervalo de confianza

5. Discusión

Actualmente, los vectores virales con mayor potencial para ser usados en modelos preclínicos y ensayos clínicos son aquellos derivados de los AAV (Greenberg, 2017). Factores intrínsecos de los vectores AAV tales como su nivel de bioseguridad, baja toxicidad, baja respuesta inmunológica y el tropismo selectivo hacia algunos tejidos de algunos de sus serotipos, han incrementado su popularidad y aplicación en diferentes patologías (Rangarajan, *et. al.*, 2017; Mendell, *et. al.*, 2017; Russell, *et. al.* 2017). Sin embargo, los vectores AAV presentan algunos inconvenientes, siendo el más importante la respuesta inmune del paciente al vector, principalmente la respuesta humoral dada por la presencia de NAb (Mingozzi & High, 2013). La determinación de la presencia de NAb es el primer paso en cualquier protocolo de terapia génica con vectores AAV para ser aplicado en humanos, constituyendo un criterio de exclusión en los mismos (Jeune *et. al.*, 2013). Debido a que la prevalencia y títulos de los NAb anti AAV varían según el territorio y aún entre regiones del mismo país, es fundamental caracterizar cada población antes de implementar un tratamiento (Greenberg *et. al.*, 2015). Este proyecto constituye la primera caracterización de la prevalencia combinada de NAb anti AAV en Latinoamérica en 3 diferentes serotipos (AAV1, AAV2 y AAV9).

El patrón de oro para la medición de NAb anti AAV es el ensayo de inhibición de la transducción *in vitro*. Debido a la gran heterogeneidad de los protocolos existentes en gen reportero, MOI y línea celular (Jungmann & Rapti, 2017), así como la pobre infectividad *in vitro* de los vectores AAV, es necesario estandarizar la técnica de inhibición de la transducción *in vitro* en cada laboratorio donde se desee aplicar. Este proyecto siguió las recomendaciones del *Center for Gene Therapy* del Nationwide Children's Hospital en Columbus, Ohio basados en el protocolo previamente publicado por Jungmann & Rapti (2017). Entre los factores que fueron considerados para nuestro proyecto se consideraron uso de un gen reportero específico, la línea celular y el valor de MOI a utilizar. Se ha descrito que la GFP tiene menor sensibilidad que otros genes reporteros, incluyendo la luciferasa (Jungmann & Rapti, 2017), sin embargo el GFP se mantuvo como gen reportero debido a su alta estabilidad, su costoefectividad, facilidad de uso y buen rango de lectura por el lector de microplacas, permitiendo una amplia reproducibilidad en los datos (Naylor, 1999). La línea celular utilizada, HEK293, fue seleccionada debido a su fácil mantenimiento *in vitro* y buen rango de infectividad en presencia de vectores AAV (Jungmann & Rapti, 2017). Protocolos como el de Meliani y colaboradores (2015) sugieren utilizar la línea celular 2V6.11, la cual corresponde a una línea HEK293 modificada para facilitar la entrada de vectores AAV, sin embargo, esta no se encuentra disponible comercialmente, limitando su reproducibilidad.

Una modificación importante del presente protocolo frente a los previamente publicados por Jungmann & Rapti (2017) y Meliani (2015) es la elección del valor de MOI basados en curvas de calibración con regresiones lineales, permitiendo una correcta estimación del título de NAb, especialmente teniendo en cuenta su definición operativa (primer título en el cual se disminuya la señal del gen reportero en un 50%). Los protocolos publicados por el equipo de Jungmann (2017) y Meliani (2015) proponen el criterio de elección de MOI basado únicamente en la señal del gen

reportero, más exactamente definen el MOI ideal como la cantidad más baja de virus que muestre señal por encima de señal de fondo y debajo del nivel de saturación del equipo, sin realizar una curva de calibración o una regresión lineal, lo cual limita la correlación entre la señal y la entrada de los vectores AAV.

Otra modificación importante frente a los protocolos previamente publicados consiste en el tratamiento con neuraminidasa a las células previo a la infección con AAV9. Este tratamiento resultó en un incremento de la transfección celular del serotipo AAV9 cuando es usado *in vitro* (Zhu *et. al.*, 2018). La neuraminidasa facilita la entrada del vector AAV9 a la célula y evita la necesidad de utilizar virus adyuvantes como adenovirus, lo cual requeriría aumentar el nivel de bioseguridad necesario (Jungmann & Rapti, 2017).

La población seleccionada para el estudio, tanto en el grupo casos como controles no presenta variabilidad significativa en sus variables demográficas, incluyendo edad (media de grupo casos= 60,7, media de grupo control= 59,4, p:0,86) y sexo (75% hombres, 25% mujeres en los dos grupos), lo cual incrementa la validez del proceso de pareamiento y el análisis estadístico realizado. A pesar de que el grupo control tiene un perfil de comorbilidades similar a la del grupo casos, al realizar un estadístico de chi cuadrado se puede observar una diferencia significativa entre los casos y los participantes del grupo control en enfermedad renal (p: 0.016) e IAM (p<0.001), lo cual puede deberse a la fisiopatología de la FC (Ponikowski *et. al.*, 2015). Con relación al sitio de origen y procedencia, se puede observar una tendencia a la migración del campo a la ciudad tanto en los participantes del grupo casos como en el grupo control, con un alto porcentaje de personas que afirman ser natural de alguna zona rural en el país y una disminución marcada de participantes que afirman tener su domicilio actual en zona rural.

Uno de los limitantes en el estudio es la localización geográfica de los participantes del grupo control. A pesar de que los casos tenían una variación geográfica amplia en procedencia, la mayoría de los participantes del grupo control tienen su domicilio en áreas urbanas de Santander. Esta limitante en pareamiento restringe la extrapolación de los resultados a otras áreas del país, y ocasiona pérdida de poder estadístico, especialmente al analizar variables socioeconómicas y de acceso a servicios públicos. Por esta razón debería considerarse un pareamiento regional o de procedencia (urbana o rural) adicional al sexo y edad en futuros estudios. Sin embargo, el presente estudio permite comparar sus resultados a nivel global con los resultados de otras regiones del mundo donde la prevalencia de NAb han sido previamente reportada.

Una vez realizado el análisis de los niveles de NAb anti AAV contra los serotipos evaluados, se pudo observar que no existen diferencias significativas entre los participantes del grupo casos y del grupo control para ningún serotipo, ni de manera individual, ni en la prevalencia combinada de los mismos. El serotipo más prevalente tanto en el grupo casos como en el grupo control fue AAV2 (43-45%), seguido de AAV1 (33,3%) y AAV9 (20-23,3%), lo cual corresponde con lo reportado por diversos autores en la literatura (Calcedo *et. al.*, 2009; Jungmann & Rapti, 2017). Comparando estos resultados con los reportados a nivel mundial podemos observar que tanto participantes del grupo casos como los del grupo control presentan niveles más altos de exposición a AAV1 (Grupo casos= 33,3%, Grupo control=33,3%) y AAV2 (Grupo casos= 43%, Grupo control=45%) en comparación a reportes anteriores de personas sanas en EE.UU. (AAV1= 20%, AAV2=28%) (Calcedo *et. al.*, 2009), aunque más bajos que los previamente reportados en África (AAV1= 43%, AAV2=56%) (Calcedo *et. al.*, 2009), y China (AAV1= 69,8%, AAV2= 96,6%) (Liu *et. al.*, 2013). La prevalencia de AAV9 para ambos grupos (Grupo casos=20%, Grupo control= 23,3%) es menor que la previamente reportada en la literatura en Japón (32,9%) (Mimuro

et. al., 2014) y Francia (33,5%) (Boutin *et. al.*, 2010). Cabe destacar que los niveles de AAV1 en este estudio son más bajos que los informados en algunos países europeos como Francia (59%) (Boutin *et. al.*, 2010; Veron *et. al.*, 2012) y Holanda (79%) (van der Marel *et. al.*, 2011).

En ambos grupos, un gran porcentaje de las muestras positivas para algún serotipo fueron simultáneamente positivas para dos o más de los serotipos analizados (casos= 44%, controles= 50%), lo cual sugiere coinfección o altos niveles de reactividad cruzada de los NAb entre los serotipos. Más del 50% de las muestras positivas para AAV1 y AAV2, tanto en el grupo casos como en el grupo control presentaron títulos de NAb mayores a 1:800, en contraste con los títulos de AAV9, 80% de los cuales eran menores a 1:100. Este hallazgo junto a la observación de que el 93% de muestras positivas para AAV9 en ambos grupos también eran positivas para AAV1 o 2, podría sugerir que la actividad neutralizante contra AAV9 en esta muestra se debe a reactividad cruzada posterior a exposición natural a serotipos más prevalentes en la naturaleza. Este fenómeno ha sido descrito previamente en estudios de reactividad cruzada en primates inoculados con AAV2, cuyo suero mostró actividad neutralizante contra serotipos poco prevalentes a los cuales no habían registrado exposición (Calcedo & Wilson, 2016).

No se observan diferencias entre los títulos de NAb anti AAV1 ni anti AAV9 entre el grupo casos y el grupo control. Sin embargo, se observan diferencias entre los títulos de NAb anti AAV2 en ambos grupos, debido a que los casos presentan una mayor proporción de muestras con títulos mayores a 1:800 (66,6% (18)) que los controles (48,1% (13)). Se resaltan también las diferencias observadas en el perfil de reactividad cruzada entre los participantes del grupo casos y el grupo control, el 34% las muestras positivas del grupo casos presentaron reactividad contra los tres serotipos evaluados, mientras que en los participantes del grupo control sólo un 9% de las muestras positivas presentaron NAb contra los tres serotipos. Estos resultados sugieren

diferencias en la exposición a AAV entre casos y controles, las cuales podrían estar ligadas a riesgos secundarios a la patología de base (FC en el grupo casos), como aumento en frecuencia hospitalización o número de cirugías, ambos factores de riesgo significativos según los resultados de las regresiones logísticas realizadas en el presente estudio.

Respecto a variables demográficas evaluadas, en nuestra población no se halló relación entre la presencia de NAb para todos los serotipos y sexo y edad. Aunque la relación entre sexo y NAb es controversial y aún es sujeto de debate (Calcedo *et. al.*, 2009; Ling *et. al.*, 2015), la relación entre edad y NAb está bien descrita, con títulos de NAb que aumentan con la edad, coincidiendo con un aumento de exposición a los AAV presentes en la naturaleza. (Blacklow *et. al.*, 1968a; Chirmule *et. al.*, 1999; Calcedo *et. al.*, 2011; Liu *et. al.*, 2013; Ling *et. al.*, 2015). La no asociación significativa entre edad y NAb en los resultados del presente estudio podría explicarse debido a la desviación a la derecha en la edad de los participantes; se ha reportado que los niveles de NAb aumentan según la edad, con población sana mayor de 40 años presentando mayor prevalencia y mayores títulos de NAb contra AAV que los menores de 40 años (Mimuro *et. al.*, 2014).

Ling y colaboradores (2015) reportaron previamente una correlación significativa entre presencia de NAb y el estado nutricional de los participantes caracterizados según categorías propias de la medicina tradicional china. Sin embargo, el presente estudio no observó asociación entre el índice de masa corporal, la presencia de obesidad/sobrepeso o algún factor de estilo de vida (ejercicio, tabaquismo, alcohol) con los niveles de NAb en los participantes del grupo casos o del grupo control.

Los resultados de la regresión logística binomial muestran una asociación estadísticamente significativa entre los antecedentes de exposición a tóxicos (OR=22) y antecedentes quirúrgicos (OR=14) y la presencia de NAb para al menos un serotipo en ambos grupos. Los resultados del

análisis de regresión logística multinomial de NAb, muestran asociación estadísticamente significativa entre los antecedentes toxicológicos (OR= 2,97) y número de hospitalizaciones (OR= 3,58) para las muestras positivas para sólo un serotipo evaluado. No se observaron variables significativas para la categoría de muestras positivas para dos o más serotipos evaluados. El modelo logístico multinomial, a pesar de ser significativo, tuvo una calidad regular de ajuste según los estadísticos pseudo-R² de McFadden (0,140) y el pseudo-R² de Cox-Snell (0,262). En futuros estudios, se hace necesario evaluar más variables poblacionales, con un mayor número de muestra que permitan obtener una regresión logística con una mejor calidad de ajuste.

En los dos modelos generados por las regresiones logísticas, tanto binomial como multinomial, se incluyeron las variables hospitalizaciones previas, acceso a agua potable y antecedente de exposición toxicológica. La relación de estas variables con la presencia de NAb no había sido reportadas previamente en la literatura. De las variables mencionadas, la única que muestra asociación estadísticamente significativa en los dos modelos es antecedente de exposición toxicológica. Esta relación entre la presencia de NAb anti AAV y exposición a tóxicos podría explicarse debido factores medioambientales o por la interacción de nanopartículas de tóxicos con el sistema inmune al momento de exposición al AAV (Kononenko, Narat, & Drobne, 2015). Estudios con mayor número de participantes son necesarios para dilucidar el verdadero papel de la exposición toxicológica en la prevalencia de NAb anti AAV.

En resumen, el presente trabajo constituye el primer estudio que correlaciona variables socioeconómicas con presencia de NAb anti AAV. Futuros estudios deben tomar datos clínicos, de exposición ambiental y acceso a servicios básicos, teniendo un énfasis especial en las 3 variables incluidas en los modelos de regresión (acceso a agua potable, hospitalización y exposición a tóxicos). De igual manera se requieren más datos poblacionales con una población más

heterogénea que tenga una mayor representatividad de zonas rurales para poder llegar a establecer con mayor claridad los factores de riesgo para presencia de NAb contra 1 o más serotipos en nuestra población.

6. Conclusiones

El protocolo de neutralización *in vitro* para la detección de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos AAV1, AAV2 y AAV9 estandarizado en el presente trabajo mostró ser un ensayo seguro, fácil de realizar, con bajo de riesgo de bioseguridad y altamente reproducible. Este protocolo puede ser usado en el futuro para estudios poblacionales que determinen los niveles de NAb anti AAV, permitiendo la implementación de tratamientos de terapia génica en la región.

Los resultados de este trabajo proveen, por primera vez, datos sobre la prevalencia de NAb contra AAV serotipo AAV1, AAV2 y AAV9 en individuos procedentes de Latinoamérica. La prevalencia de NAb en esta muestra de casos con falla cardíaca y controles sanos es mayor que el rango reportado por la literatura para algunas regiones como Estados Unidos, y menor que los reportados en otras localizaciones geográficas como África y China, lo cual resalta la importancia de realizar estudios poblacionales para cada región geográfica. El serotipo AAV2 presentó mayor prevalencia de NAb anti AAV en comparación a los otros serotipos evaluados en este estudio.

No se observó diferencia entre los niveles de NAb entre casos afectados por falla cardíaca y controles sanos en nuestra población. Aproximadamente un 25% de los participantes del grupo

casos y el grupo control presentan prevalencia combinada de NAb contra 2 o más serotipos. No se observó diferencia en la prevalencia combinada de NAb en los dos grupos evaluados.

Adicionalmente, no se presentaron diferencias en la prevalencia de NAb entre hombres o mujeres, ni asociación de NAb con edad en esta población. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la prevalencia de NAb contra cualquier serotipo en casos y controles y antecedente de exposición toxicológica, sugiriendo una posible asociación ambiental. Dicha asociación también fue encontrada entre NAb contra cualquier serotipo y la presencia de antecedente de hospitalización previa, lo cual podría indicar exposición a AAV en un ámbito hospitalario.

Finalmente, estudios poblacionales con un mayor número de participantes son necesarios para poder establecer claramente el efecto de las variables socioeconómicas y clínicas en la prevalencia de NAb en nuestra población, con un pareamiento que incluya procedencia o lugar de domicilio como factor de inclusión. Estos cambios permitirán establecer con mayor claridad las variables asociadas a una mayor prevalencia combinada de NAb anti AAV en nuestra población y en Latinoamérica. Este estudio constituye el primer reporte que evalúa y describe la prevalencia y los niveles de NAb anti AAV en Latinoamérica y constituye la base de futuros análisis cuyo objetivo es la implementación de terapias génicas basadas en vectores AAV en nuestra población

Referencias bibliográficas

- Agbandje-McKenna, M., & Kleinschmidt, J. (2012). AAV capsid structure and cell interactions. In Adeno-Associated Virus (pp. 47-92). Humana Press.
- Basner-Tschakarjan, E., & Mingozzi, F. (2014). Cell-mediated immunity to AAV vectors, evolving concepts and potential solutions. Immune responses to AAV vectors, from bench to bedside. *Frontiers in immunology*. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00350>
- Bish, L. T., Morine, K., Sleeper, M. M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., *et. al.* (2008). Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Human gene therapy*, 19(12), 1359-1368.
- Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., & Rowe, W. P. (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *Journal of the National Cancer Institute*, 40(2), 319-327.
- Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Kapikian, A. Z., Austin, J. B., & Rowe, W. P. (1968). Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *American journal of epidemiology*, 88(3), 368-378.
- Bocchi, E. A. (2013). Heart failure in South America. *Current cardiology reviews*, 9(2), 147-156.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., & Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus

- (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy*, 21(6), 704-712.
- Calcedo R, Wilson JM. (2013) Humoral Immune Response to AAV. *Frontiers in immunology*. 4:341. doi: 10.3389/fimmu.2013.0034
- Calcedo, R., & Wilson, J. M. (2016). AAV natural infection induces broad cross-neutralizing antibody responses to multiple AAV serotypes in chimpanzees. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 27(2), 79-82.
- Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Wilson, J. M. (2011). Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 18(9), 1586–1588. <http://doi.org/10.1128/CVI.05107-11>
- Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., & Wilson, J. M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(3), 381–390. <http://doi.org/10.1086/595830>
- Chirmule, N., Propert, K. J., Magosin, S. A., Qian, Y., Qian, R., & Wilson, J. M. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene therapy*, 6(9), 1574-1583.
- Corden, A., Handelman, B., Yin, H., Cotrim, A., Alevizos, I., & Chiorini, J. A. (2017). Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in Sjögren's patients: implications for gene therapy. *Gene Therapy*
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 583-593.

- Deverman, B. E., Pravdo, P. L., Simpson, B. P., Kumar, S. R., Chan, K. Y., Banerjee, A., *et al.* (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nature biotechnology*, 34(2), 204.
- Dudek, A. M., Pillay, S., Puschnik, A. S., Nagamine, C. M., Cheng, F., Qiu, J., *et al.* (2018). An alternate route for adeno-associated virus entry independent of AAVR. *Journal of virology*, JVI-02213
- Erles, K., Seböková, P., & Schlehofer, J. R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *Journal of medical virology*, 59(3), 406-411
- Food and Drug Administration. (2015). Considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products. Disponible en <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
- Ferla, R., Claudiani, P., Savarese, M., Kozarsky, K., Parini, R., Scarpa, M, *et al.*, S. (2015). Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Serotype 8 Neutralizing Antibodies and Arylsulfatase B Cross-Reactive Immunologic Material in Mucopolysaccharidosis VI Patient Candidates for a Gene Therapy Trial. *Human gene therapy*, 26(3), 145-152.
- Gao, M. H., Lai, N. C., McKirnan, M. D., Roth, D. A., Rubanyi, G. M., Dalton, N, *et al.* (2004). Increased regional function and perfusion after intracoronary delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Human Gene Therapy*, 15(6), 574–587. <http://doi.org/10.1089/104303404323142024>

- Gómez, E. (2016). Capítulo 2. Introducción, epidemiología de la falla cardiaca e historia de las clínicas de falla cardiaca en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23, 6-12.
- Greenberg, B. (2017). Gene therapy for heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 27(3), 216-222.
- Greenberg, B., Butler, J., Felker, G. M., Ponikowski, P., Voors, A. A., Pogoda, J. M., *et. al.* (2015). Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene therapy*.
- Grimm, D., Lee, J. S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T. A., & Kay, M. A. (2008). In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *Journal of virology*, 82(12), 5887-5911.
- Gupta, S., Indelicato, S. R., Jethwa, V., Kawabata, T., Kelley, M., Mire-Sluis, A. R., *et. al.* (2007). Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *Journal of immunological methods*, 321(1), 1-18.
- Halbert, C. L., Miller, A. D., Mcnamara, S., Emerson, J., Gibson, R. L., Ramsey, B., & Aitken, M. L. (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy*, 17(4), 440-447.
- Harrington, E., Sloan, J., Chandler, R., McGuire, P., Wilson, J., & Venditti, C. (2016). Neutralizing antibodies against adeno-associated viral capsids in patients with methylmalonic acidemia. *Human gene therapy*. DOI: 10.1089/hum,2015.092

- Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E. L., Bell, P., & Wilson, J. M. (2018). The neurotropic properties of AAV-PHP. B are limited to C57BL/6J mice. *Molecular Therapy*, 26(3), 664-668.
- Hulot, J. S., Ishikawa, K., & Hajjar, R. J. (2016). Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur Heart J* 2016; 37:1651-1658.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., & Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 459(1), 70-83.
- Jeune, V., Joergensen, J. A., Hajjar, R. J., & Weber, T. (2013). Pre-existing anti-Adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Human gene therapy methods*, 24(2), 59-67.
- Jungmann, A., Müller, O., & Rapti, K. (2017). Cell-Based Measurement of Neutralizing Antibodies Against Adeno-Associated Virus (AAV). *Cardiac Gene Therapy: Methods and Protocols*, 109-126.
- Kononenko, V., Narat, M., & Drobne, D. (2015). Nanoparticle interaction with the immune system/Interakcije nanodelcev z imunskim sistemom. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(2), 97-108.
- Kumar, S. R., Markusic, D. M., Biswas, M., High, K. A., & Herzog, R. W. (2016). Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3, 16034.
- Ledford, H. (2017). FDA advisers back gene therapy for rare form of blindness. *Nature News*, 550(7676), 314.

- Li, C., Narkbunnam, N., Samulski, R. J., Asokan, A., Hu, G., Jacobson, L. J., *et. al.* (2012). Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene therapy*, 19(3), 288-294.
- Li, C., Wu, S., Albright, B., Hirsch, M., Li, W., Tseng, Y. S., *et. al.* (2015). Development of patient-specific AAV vectors after neutralizing antibody selection for enhanced muscle gene transfer. *Molecular Therapy*.
- Ling, C., Wang, Y., Feng, Y. L., Zhang, Y. N., Li, J., Hu, X. R., *et. al.* (2015). Prevalence of neutralizing antibodies against liver-tropic adeno-associated virus serotype vectors in 100 healthy Chinese and its potential relation to body constitutions. *Journal of integrative medicine*, 13(5), 341-346.
- Liu, Q., Huang, W., Zhao, C., Zhang, L., Meng, S., Gao, D., & Wang, Y. (2013). The prevalence of neutralizing antibodies against AAV serotype 1 in healthy subjects in China: implications for gene therapy and vaccines using AAV1 vector. *Journal of medical virology*, 85(9), 1550-1556.
- Maheshri, N., Koerber, J. T., Kaspar, B. K., & Schaffer, D. V. (2006). Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nature biotechnology*, 24(2), 198.
- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., *et. al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV- Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine*, 12(3), 342–347.
[http://doi.org/10,1038/nm1358](http://doi.org/10.1038/nm1358)

- Meliani, A., Leborgne, C., Triffault, S., Jeanson-Leh, L., Veron, P., & Mingozzi, F. (2015). Determination of anti-adenovirus vector neutralizing antibody titer with an in vitro reporter system. *Human gene therapy methods*, 26(2), 45-53.
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., *et al.* (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine*, 377(18), 1713-1722.
- Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., *et al.* (2014). The prevalence of neutralizing antibodies against adenovirus capsids is reduced in young Japanese individuals. *Journal of medical virology*, 86(11), 1990-1997.
- Mingozzi, F., & Büning, H. (2015). Adeno-associated viral vectors at the frontier between tolerance and immunity. Immune responses to AAV vectors, from bench to bedside, *Frontiers in immunology*. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00120>
- Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews genetics*, 12(5), 341-355.
- Mingozzi, F., & High, K. A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*, 122(1): 23–36.
- Mingozzi, F., Chen, Y., Edmonson, S. C., Zhou, S., Thurlings, R. M., Tak, P. P. *et al.* (2013). Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene therapy*, 20(4), 417-424.

- Mingozzi, F., Hasbrouck, N. C., Basner-Tschakarjan, E., Edmonson, S. A., Hui, D. J., Sabatino, D. E., *et. al.* (2007). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood*, 110(7), 2334-2341.
- Misra, S. (2013). Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India*, 61(2), 127-33.
- Morabito, G., Giannelli, S. G., Ordazzo, G., Bido, S., Castoldi, V., Indrigo, M., *et. al.* (2017). AAV-PHP. B-mediated global-scale expression in the mouse nervous system enables GBA1 gene therapy for wide protection from synucleinopathy. *Molecular Therapy*, 25(12), 2727-2742.
- Murphy, S. L., Li, H., Mingozzi, F., Sabatino, D. E., Hui, D. J., Edmonson, S. A., & High, K. A. (2009). Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. *Journal of medical virology*, 81(1), 65-74.
- Naylor, L. H. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical pharmacology*, 58(5), 749-757.
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G., Coats, A. J., *et. al.* (2015). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European heart journal*, ehw128.
- Pillay, S., Meyer, N. L., Puschnik, A. S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y. A., *et. al.* (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*, 530(7588), 108.

- Pillay, S., Zou, W., Cheng, F., Puschnik, A. S., Meyer, N. L., Ganaie, S. S., *et. al.* (2017). AAV serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular receptor AAVR. *Journal of virology*, JVI-00391.
- Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., *et. al.* (2017). AAV5–factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2519-2530
- Rincon, M. Y., Prada, C. E., Lopez, M., Castillo, V., Echeverria, L. E., & Serrano, N. (2016). Determination of Anti-Adeno-Associated Viral Vector Neutralizing Antibodies in Patients with Heart Failure in the Cardiovascular Foundation of Colombia (ANVIAS): Study Protocol. *JMIR research protocols*, 5(2).
- Rincon, M. Y., VandenDriessche, T., & Chuah, M. K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular research*, 108(1), 4-20
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., *et. al.* (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10097), 849-860.
- Shareef, M. A., Anwer, L. A., & Poizat, C. (2014). Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. *European Journal of Pharmacology*, 724, 1–8.
<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.018>

SISPRO, Sistema integral de la información social, Ministerio de Protección Social, Mortalidad por Insuficiencia Cardíaca e en Colombia en el año 2016, Recuperado de la Web:

http://www.sispro.gov.co/Pages/TC_PDSP.aspx el 2 de Noviembre de 2018.

Thwaite, R., Pages, G., Chillon, M., & Bosch, A. (2015). AAVrh. 10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy. *Gene therapy*, 22(2), 196-201.

van der Marel, S., Comijn, E. M., Verspaget, H. W., van Deventer, S., van den Brink, G. R., Petry, H., *et. al.* (2011). Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: Implications for gene therapy. *Inflammatory bowel diseases*, 17(12), 2436-2442.

Vance, M. A., Mitchell, A., & Samulski, R. J. (2015). AAV biology, infectivity and therapeutic use from bench to clinic. In *Gene Therapy-Principles and Challenges*. InTech.

Veron, P., Leborgne, C., Monteilhet, V., Boutin, S., Martin, S., Moullier, P., & Masurier, C. (2012). Humoral and cellular capsid-specific immune responses to adeno-associated virus type 1 in randomized healthy donors. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6418-6424.

Wagner, J. A., Nepomuceno, I. B., Messner, A. H., Moran, M. L., Batson, E. P., Dimiceli, S., *et. al.* (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Human gene therapy*, 13(11), 1349-1359.

Wang, M., Crosby, A., Hastie, E., Samulski, J. J., McPhee, S., Joshua, G., *et. al.* (2015). Prediction of adeno-associated virus neutralizing antibody activity for clinical application. *Gene therapy*, 22(12), 984-992.

Weitzman, M. D., & Linden, R. M. (2012). Adeno-associated virus biology. In Adeno-Associated Virus (pp. 1-23). Humana Press.

Willett, K., & Bennett, J. (2015). Immunology of AAV-mediated gene transfer in the eye., Immune responses to AAV vectors, from bench to bedside. *Frontiers in immunology*. doi: [doi.org/10.3389/fimmu,2013.00261](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00261)

Zhu, H., Wang, T., John Lye, R., French, B. A., & Annex, B. H. (2018). Neuraminidase-mediated desialylation augments AAV9-mediated gene expression in skeletal muscle. *The journal of gene medicine*, 20(9), e3049

Apéndice A- Variables recolectadas en los participantes del estudio

Variables de Identificación

1. Edad (Años cumplidos)
2. Género
3. Raza
4. Origen (Rural vs Urbano)
5. Departamento de origen
6. Nivel educativo
7. Seguridad social
8. Domicilio (Rural vs Urbano)
9. Departamento de Domicilio

Antecedentes patológicos

10. Diabetes Mellitus
11. HTA
12. Dislipidemia
13. Enfermedad autoinmune
14. Enfermedad renal
15. Último nivel de creatinina
16. Presencia de Obesidad/Sobrepeso
17. Clase de alteración metabólica (Obesidad/ Sobrepeso)

18. Infarto Agudo de Miocardio
19. Años desde último Infarto Agudo de Miocardio
20. Mieloma Múltiple
21. Leucemia Mieloide Crónica
22. Otros antecedentes

Falla Cardíaca

23. Años desde diagnóstico de FC
24. Estadío inicial (CRITERIOS AHA)
25. Estadío actual (CRITERIOS AHA)
26. Hospitalizaciones por FC (Si/No)
27. Número de hospitalizaciones
28. Ortopnea

Antecedentes gineco obstétricos (Mujer)

29. Fecha de última menstruación
30. Fecha de último parto
31. Embarazos
32. Partos
33. Cesáreas
34. Vivos
35. Abortos
36. Mortinatos

37. Ectópicos

Otros antecedentes

38. Quirúrgicos (Si/No)

39. Quirúrgico (Nombre)

40. Traumáticos (Si/No)

41. Traumático (Nombre)

42. Toxicológicos (Si/No)

43. Toxicológicos (Nombre)

44. Alérgicos

45. Alérgicos (Nombre)

Estilo de vida

46. Actividad Física

47. Minutos de ejercicio diario

48. Dias a la semana de ejercicio

49. Consumo de tabaco

50. Cigarrillos/día

51. Edad Inicio de Consumo

52. Edad de cese de consumo

53. Consumo de alcohol (Si/No)

54. Unidades de bebida estándar por ocasión

- 55. Consumo de alcohol
- 56. Unidades de bebida estándar por ocasión

Transfusiones

- 57. Antecedente de trasfusión (Si/No)
- 58. Unidad de glóbulos rojos
- 59. Plaquetas
- 60. Plasma fresco congelado
- 61. Años desde última transfusión

Vivienda

- 62. Servicio sanitario en el hogar
- 63. Agua para consumo y preparación de alimentos
- 64. Recolección basuras
- 65. Alcantarillado

Otros

- 66. Viaje en último año (Si/No)
- 67. Lugar de viaje
- 68. Cambio de residencia en último año
- 69. Lugar de última residencia

Paraclínicos

- 70. Hemoglobina
- 71. Leucocitos totales ($\times 10^3$ /uL)
- 72. Plaquetas ($\times 10^3$ /uL)
- 73. Fracción de Eyección (%)
- 74. Insuficiencia mitral (Si/No)

Examen físico

- 75. Índice de Masa Corporal
- 76. Ruidos cardíacos
- 77. Soplos (Si/No)
- 78. Soplo (Sistólico /Diastólico)
- 79. Grado de Soplo
- 80. Foco de soplo
- 81. Murmullo vesicular
- 82. Agregados
- 83. Alteraciones en Cabeza y cuello
- 84. Alteraciones en Cabeza y cuello (Tipo)
- 85. Alteraciones en Tórax
- 86. Alteraciones en Tórax (Tipo)
- 87. Alteraciones en Abdomen
- 88. Alteraciones en Abdomen (Tipo)
- 89. Alteraciones en Extremidades

- 90. Alteraciones en Extremidades (Tipo)
- 91. Neurológico
- 92. Neurológico (Tipo)
- 93. Alteraciones en Piel y faneras
- 94. Alteraciones en Piel y faneras (Tipo)